

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20240225

网络首发日期: 2025-05-06; 网络首发地址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.n.20250502.1745.002>

L-异亮氨酸生产菌的苏氨酸脱水酶特性及应用

孙浩, 芦楠, 尹亚群, 魏敏华, 张成林

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 苏氨酸脱水酶(threonine dehydratase, TD)是 α -酮丁酸和L-异亮氨酸生物合成途径中的关键酶,其活性受L-异亮氨酸的反馈抑制。对来源于L-异亮氨酸生产菌株谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) YI的苏氨酸脱水酶TD^{YI}进行序列分析,发现其363位L-脯氨酸突变为L-亮氨酸(P363L)。酶学实验结果表明,该酶解除了L-异亮氨酸的反馈抑制作用。TD^{YI}的米氏常数(K_m)、最大反应速率(v_{max})、催化常数(K_{cat})及 K_{cat}/K_m 分别为8.7 mmol/L、88.2 μ mol/(min·mg)、9.2 s⁻¹和1.06 L/(mmol·s),其最适pH和温度分别为7.0和35℃,与野生型TD无明显差异,表明P363L突变对TD^{YI}的催化性能无显著影响。将TD^{YI}应用于 α -酮丁酸和L-异亮氨酸的合成,其产量分别达到13.3 g/L和5.3 g/L,且TD^{YI}效果优于大肠杆菌来源的抗L-异亮氨酸反馈抑制的TD^M。本研究从L-异亮氨酸生产菌株*C. glutamicum* YI中挖掘出解除L-异亮氨酸反馈抑制的TD^{YI},可为 α -酮丁酸、L-异亮氨酸及其衍生物的生物合成提供参考。

关键词: 苏氨酸脱水酶; 酶学特性; α -酮丁酸; L-异亮氨酸; 谷氨酸棒杆菌; 大肠杆菌

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2026)03-0038-09

Characteristics and Application of Threonine Dehydratase from L-Isoleucine Producing Strain

SUN Hao, LU Nan, YIN Yaquin, WEI Minhua, ZHANG Chenglin

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Threonine dehydratase (TD) is a key enzyme in the biosynthesis pathways of α -ketobutyrate and L-isoleucine, and its activity is subject to the feedback inhibition by L-isoleucine. In this study, sequence of TD^{YI} from the L-isoleucine producing strain *Corynebacterium glutamicum* YI was analyzed. The L-proline at 363rd site was substituted by L-leucine (P363L) in TD^{YI}. Enzymatic assays demonstrated that the feedback inhibition by L-isoleucine of TD^{YI} was abolished. Meanwhile, TD^{YI} exhibited a K_m of 8.7 mmol/L, a v_{max} of 88.2 μ mol/(min·mg), a K_{cat} of 9.2 s⁻¹, and a K_{cat}/K_m of 1.06 L/(mmol·s). Its optimal pH and temperature were 7.0 and 35℃, respectively, similar with those of the wild-type TD, indicating that the P363L mutation did not markedly affect the catalytic performance of TD^{YI}. Subsequently, TD^{YI} were applied in biosynthesis of α -ketobutyrate and L-isoleucine, achieving a production of 13.3 and 5.3 g/L, respectively, significantly higher than those of the strains harboring TD^M derived from *Escherichia coli*. This study identified and characterized TD^{YI}, a feedback-inhibition-relieved threonine dehydratase from the industrial strain *C. glutamicum* YI. The findings provide a valuable reference for the biosynthesis of α -ketobutyrate, L-isoleucine, and their related products.

Key words: threonine dehydratase; enzymatic properties; α -ketobutyrate; L-isoleucine; *Corynebacterium glutamicum*; *Escherichia coli*

引文格式:

孙浩, 芦楠, 尹亚群, 等. L-异亮氨酸生产菌的苏氨酸脱水酶特性及应用[J]. 天津科技大学学报, 2026, 41(3): 38–46.

SUN H, LU N, YIN Y Q, et al. Characteristics and application of threonine dehydratase from L-isoleucine producing

收稿日期: 2024-11-08; 修回日期: 2025-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(32170049); 天津市自然科学基金项目(23JCYBJC00860)

作者简介: 孙浩(2000—), 男, 安徽省宣城人, 硕士研究生; 通信作者: 张成林, 教授, zcl@tust.edu.cn

strain[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2026, 41 (3) : 38–46.

苏氨酸脱水酶 (threonine dehydratase, TD, EC 4.3.1.19) 催化 *L*-苏氨酸脱氨形成 α -酮丁酸和 NH_4^+ ^[1]。现已发现两种不同类型的苏氨酸脱水酶: 合成代谢型苏氨酸脱水酶 (biosynthetic threonine dehydratase, BTD) 和分解代谢型苏氨酸脱水酶 (catabolic threonine dehydratase, CTD), 分别在有氧和无氧条件下发挥功能^[2], 二者均属于磷酸吡哆醛依赖型酶^[3]。

L-异亮氨酸生物合成途径及其代谢调控如图 1 所示。 α -酮丁酸和丙酮酸经乙酰乳酸合酶催化形成 α -乙酰羟丁酸, 以合成 *L*-异亮氨酸^[4]。此外, 乙酰乳酸合酶还可催化两分子丙酮酸缩合形成 α -乙酰乳酸用于合成 *L*-缬氨酸和 *L*-亮氨酸^[5]。由此可见, 苏氨酸脱水酶是决定这 3 种分支链氨基酸合成的关键酶: 当苏氨酸脱水酶活力高时, α -酮丁酸合成充足, 代谢流更多地流向 *L*-异亮氨酸合成途径; 反之, 苏氨酸脱水酶活力不足时缺乏 α -酮丁酸, 代谢流则流向 *L*-缬氨酸和 *L*-亮氨酸合成途径。苏氨酸脱水酶受 *L*-异亮氨酸的反馈抑制, 因此该酶成为 α -酮丁酸和 *L*-异亮氨酸合成的瓶颈^[6]。

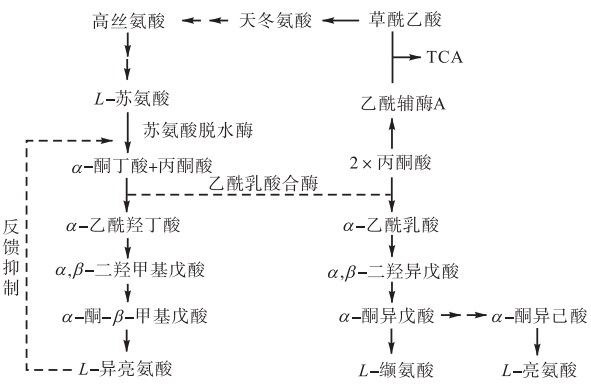


图 1 *L*-异亮氨酸生物合成途径及其代谢调控
Fig. 1 Biosynthesis pathway and metabolic regulation of *L*-isoleucine

在不同微生物中, 苏氨酸脱水酶的调控机制存在差异^[2]。大肠杆菌含有 BTD 和 CTD, 但前者起主要作用, 受 *L*-异亮氨酸的反馈抑制和 *L*-缬氨酸的激活^[7-8]。与之不同, 谷氨酸棒杆菌仅具有 BTD, 受 *L*-异亮氨酸的反馈抑制^[9]。BTD 的 N-端和 C-端分别为催化结构域和调控结构域; *L*-异亮氨酸与调控结构域结合后, 该酶空间构象改变, 阻碍其与底物 *L*-苏氨酸的结合, 使其活性降低或失活^[9]。

近年来, 研究人员获得了多个苏氨酸脱水酶突变体, 并应用于 *L*-异亮氨酸合成 (表 1)。Guo 等^[11]通过

定点突变谷氨酸棒杆菌苏氨酸脱水酶的调控结构域 (F383A), 解除了 *L*-异亮氨酸的反馈抑制, 但其活性有所下降。Möckel 等^[12]利用苏氨酸脱水酶筛选体系获得了 19 个突变体, 其中 TD^{H278R/L351S} 完全解除了 *L*-异亮氨酸的反馈抑制, 但其最大反应速率 ($v_{\max}$) 降低至 $26 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, 较野生型下降 72%, 其他 18 个突变体的酶活力也有不同程度的降低。Morbach 等^[13]获得解除 *L*-异亮氨酸反馈抑制的突变体 TD^{H278R/L351S}, 利用该突变体使 *L*-异亮氨酸产量提高 43.2%。

综上所述, 解除苏氨酸脱水酶的反馈抑制是高效合成 *L*-异亮氨酸的关键。从工业微生物中挖掘解除抑制物反馈抑制的关键酶突变体, 是代谢工程常用手段^[14]。谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) YI 为目前工业化生产 *L*-异亮氨酸所用菌株, 推测其苏氨酸脱水酶解除了 *L*-异亮氨酸的反馈抑制。本文分析 *C. glutamicum* YI 中苏氨酸脱水酶序列, 并测定其酶学特性, 考察其对 α -酮丁酸和 *L*-异亮氨酸生物合成的影响。

表 1 苏氨酸脱水酶突变体及其在 *L*-异亮氨酸合成中的应用
Tab. 1 Threonine dehydratase mutants and their application in *L*-isoleucine synthesis

<i>ilvA</i> 来源菌株	基因型	<i>L</i> -异亮氨酸产量/ (g/L)	参考文献
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> sva1065 Δ <i>tdh</i> Δ <i>ilvA</i> :: <i>ilvA</i> ^{C1252T}	11.3	[6]
	<i>E. coli</i> sva1065 Δ <i>tdh</i> Δ <i>ilvA</i> :: <i>ilvA</i> ^{C1252T/A1253T}	13.5	[6]
	<i>E. coli</i> sva10658 Δ <i>tdh</i> Δ <i>ilvA</i> :: <i>ilvA</i> ^{C1252T/A1253G/C1254G}	14.6	[6]
	<i>E. coli</i> THRD P _{<i>ilvLXGMED</i>} A::P _{<i>trc</i>} /pWSK29- <i>ilvIH</i> ^{trc} - <i>ilvA</i> ^{C1339T/G1341T/C1351G/T1352C}	2.2	[15]
	ATCC 14067/ <i>ilvA</i> ^{G418A}	0.5	[11]
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 14067/ <i>ilvA</i> ^{T1147G/T1148C}	0.6	[11]
	ATCC 14067/ <i>ilvA</i> ^{G418A/T1147G/T1148C}	0.7	[11]
	DR17/pECM3- <i>ilvA</i> ^{A833G/T1052C}	12.6	[13]
	<i>C. glutamicum</i> MH20-22B/pECM3- <i>ilvA</i> ^{T968C}	1.2	[16]
	JHI3-156/pDXW-8- <i>ilvA</i> ^{T1147G/T1148C}	3.5	[17]
	CA10-3101 ATCC13032	3.3	[18]
	<i>hom</i> ^{G1220A} - <i>ilvA</i> ^{A1141G/G1143T/T1147G/T1148C}	0.2	[19]
	W3110/pET28a- <i>ilvA</i> ^{G392A}	0.2	[19]
	W3110/pET28a- <i>ilvA</i> ^{T512C}	0.2	[19]
	W3110/pET28a- <i>ilvA</i> ^{T654C}	0.2	[19]

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物

菌株、质粒与引物分别见表 2 和表 3。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L, 自然 pH, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。根据需要添加卡那霉素(终质量浓度 50 μg/mL)和氨苄青霉素(终质量浓度 50 μg/mL)。配制 LB 固体培养基时添加琼脂粉(20 g/L)。

脑-心复合物培养基: 脑-心复合物 37.5 g/L, 自然 pH, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

α-酮丁酸种子培养基: 葡萄糖 25 g/L、蛋白胨 6 g/L、酵母粉 1 g/L、KH₂PO₄ 1.2 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、MnSO₄·7H₂O 0.01 g/L、维生素 B₁(V_{B1}) 1.3 mg/L、维生素 H(V_H) 0.3 mg/L、L-异亮氨酸 0.2 g/L、L-缬氨酸 0.2 g/L、L-亮氨酸

0.2 g/L、苯酚红 20 mL/L, 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

α-酮丁酸发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L、玉米浆 10 g/L、酵母粉 2 g/L、柠檬酸钠 1 g/L、KH₂PO₄ 2 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.7 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.08 g/L、MnSO₄·7H₂O 0.08 g/L、V_{B1} 0.8 mg/L、V_H 0.2 mg/L、L-异亮氨酸 0.5 g/L、L-缬氨酸 0.5 g/L、L-亮氨酸 0.5 g/L、苯酚红 20 mL/L, 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

L-异亮氨酸种子培养基: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 6 g/L、酵母粉 1 g/L、V_{B1} 1.3 mg/L、V_H 0.3 mg/L、KH₂PO₄ 1.2 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、MnSO₄·7H₂O 0.01 g/L、苯酚红 20 mL/L, 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

L-异亮氨酸发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L、玉米浆 10 g/L、MnSO₄·7H₂O 0.01 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、KH₂PO₄ 1.2 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、V_{B1} 1.0 mg/L、V_H 0.3 mg/L、苯酚红 20 mL/L, 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

表 2 菌株与质粒
Tab. 2 Strains and plasmids

菌株/质粒	特性	来源
<i>E. coli</i> DH5α	F ^Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i>	实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ^{ompT hsdS_B} (rB ⁺ mB ⁺) <i>gal dcm</i> (DE3)	实验室保藏
<i>C. glutamicum</i> YI	L-异亮氨酸生产菌株	实验室保藏
THRW-6	<i>E. coli</i> THRD <i>ΔrhtA ΔrhtC ΔilvIH ΔilvBN</i>	实验室保藏
Ile-01	W3110-02 (<i>yncI</i> : :P _{trc-ilvIH} ^{G1768A/C1777T} -T _{trc})	实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET28a	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 携带质粒 pET28a	本研究
<i>E. coli-ilvA</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 携带质粒 pET28a- <i>ilvA</i>	本研究
<i>E. coli-ilvA</i> ^{YI}	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 携带质粒 pET28a- <i>ilvA</i> ^{YI}	本研究
KA-1	THRW-6 携带质粒 pT99- <i>ilvA</i> ^{YI}	本研究
KA-2	THRW-6 携带质粒 pT99- <i>ilvA</i>	本研究
KA-3	THRW-6 携带质粒 pT99- <i>ilvA</i> ^M	本研究
ISO-1	Ile-01 携带质粒 pT99- <i>ilvA</i> ^{YI}	本研究
ISO-2	Ile-01 携带质粒 pT99- <i>ilvA</i>	本研究
ISO-3	Ile-01 携带质粒 pT99- <i>ilvA</i> ^M	本研究
pET28a	Kan ^r , 表达质粒	实验室保藏
pTrc99a	Amp ^r , 表达质粒	实验室保藏
pET28a- <i>ilvA</i>	pET28a 携带 <i>ilvA</i>	本研究
pET28a- <i>ilvA</i> ^{YI}	pET28a 携带 <i>ilvA</i> ^{YI}	本研究
pT99- <i>ilvA</i>	pTrc99a 携带 <i>ilvA</i>	本研究
pT99- <i>ilvA</i> ^M	pTrc99a 携带 <i>ilvA</i> ^M	本研究
pT99- <i>ilvA</i> ^{YI}	pTrc99a 携带 <i>ilvA</i> ^{YI}	本研究

1.1.3 试剂与仪器

NaCl 等生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司; α-酮丁酸和 L-异亮氨酸标准品, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 基因组 DNA 提取试剂盒 Wizard[®]

Genomic DNA Purification Kit A1120, 美国普洛麦格公司; 限制性内切酶和 Primer STAR HS 聚合酶, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 质粒提取试剂盒 E.Z.N.A[®] Plasmid DNA Mini Kit、PCR 产物直接回收

试剂盒 E.Z.N.A[®] Cycle-Pure Kit 和 PCR 产物切胶回收试剂盒 E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit, 美国 Omega Bio-Tek 公司; 一步法重组试剂盒 ClonExpress[®] II One Step Cloning, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒, 北京索莱宝科

技有限公司。

RePure-D(B)型基因扩增仪, 杭州柏恒科技有限公司; 752 型分光光度计, 上海分析仪器厂; ZQZY-88 型振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技公司。

表 3 引物
Tab. 3 Primers

引物	序列(5'-3')	用途
JD-28a-1	TAATACGACTCACTATAGGG	鉴定 <i>E. coli-<i>ilvA</i></i> 和 <i>E. coli-<i>ilvA</i>^{YI}</i>
JD-28a-2	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	
JD-99a-1	TGGCTGTGCAGGTCGTAAATC	鉴定 ISO-1、ISO-2 和 ISO-3
JD-99a-2	GAAACGCAAAAAGGCCATCC	
<i>ilvA</i> ^{YI} -1	CGCTGATTCATCGTCATCATC	扩增 <i>ilvA</i> ^{YI}
<i>ilvA</i> ^{YI} -2	GAAGAATTCGGAGCCACCACC	
<i>IA</i> -1	ATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCATGAGTGAAACATACGTGTCTGAGAA	扩增 <i>ilvA</i> 和 <i>ilvA</i> ^{YI} 并与 pET28a 连接
<i>IA</i> -2	TGATGATGTTAGCTAGCGCTGAATTCGTCTAGGTCAAGTATTCGTACTCAGGGG	
pT99- <i>ilvA</i> -1	ATTTACACAGGAAACAGACCATGAGTGAAACATACGTGTCTGAGAA	扩增 <i>ilvA</i> 和 <i>ilvA</i> ^{YI} 并与 pTrc99a 连接
pT99- <i>ilvA</i> -2	TCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTGTTAGGTCAAGTATTCGTACTCAGGGG	
<i>ilvA</i> ^M -1	ATGGCTGACTCGCAACCCC	扩增 <i>ilvA</i> ^M
<i>ilvA</i> ^M -2	TTGGCGAAGCGCAGAAACGCGCCCGGTGATTCCGGGAAT	
<i>ilvA</i> ^M -3	CGCGTTTCTGCGCTTCGCCAACACGCTGGGTACGTACTGGAA	
<i>ilvA</i> ^M -4	CACGCTGGGTACGTACTGGAA	
pT99- <i>ilvA</i> ^M -1	ATTTACACAGGAAACAGACCATGGCTGACTCGCAACCCC	扩增 <i>ilvA</i> ^M 并与 pTrc99a 连接
pT99- <i>ilvA</i> ^M -2	TCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTGCTAACCCGCCAAAAAGAACC	

1.2 方法

1.2.1 基因测序与序列比对

以 *C. glutamicum* YI 基因组为模板, 利用引物 *ilvA*^{YI}-1/*ilvA*^{YI}-2(序列见表 3)扩增 *ilvA*^{YI}, 回收后委托苏州金唯智生物科技有限公司测序, 用 DNAMAN 软件对测序结果进行多序列比对和分析。使用 ClustalW 和 Esript 3.0 比对苏氨酸脱水酶氨基酸序列。

1.2.2 重组质粒及菌株的构建

分别以 *C. glutamicum* ATCC 13032 和 *C. glutamicum* YI 基因组为模板, 利用引物 *IA*-1/*IA*-2 扩增 *ilvA* 和 *ilvA*^{YI}。*ilvA* 和 *ilvA*^{YI} 片段经回收后与经 *EcoR* I 酶切的 pET28a 连接, 并转化至 *E. coli* DH5 α 。在 LB 培养基上复苏后涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。随机挑选单菌落, 利用引物 JD-28a-1 和 JD-28a-2 进行菌落 PCR 验证。提取重组质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞, 经复苏后涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基, 待平板上长出单菌落后进行菌落 PCR 验证。

采用上述方法将 *ilvA* 和 *ilvA*^{YI} 片段连接至经 *EcoR* I 酶切的 pTrc99a 质粒, 经转化、复苏、培养获得单菌落。提取重组质粒分别转化至菌株 THRW-6 和 Ile-01 感受态细胞, 经复苏后涂布于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后进

行菌落 PCR 鉴定。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达、纯化及检测

分别将 *E. coli-*ilvA** 和 *E. coli-*ilvA*^{YI}* 接种至 2 L 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至吸光度 (A_{600}) 达到 0.5 时, 加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG, 终浓度为 0.1 mmol/L)。将温度降至 20 $^{\circ}$ C 后继续培养 4 h, 离心收集菌体沉淀; 随后用 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 洗涤菌体 3 次, 4 $^{\circ}$ C、6 500 r/min 离心 10 min, 用 Tris-HCl 缓冲液重悬菌体并经高压均质机破碎。利用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证重组蛋白表达, 用 Ni-NTA 树脂纯化重组蛋白, 用蛋白浓度测定试剂盒测定其浓度。

1.2.4 重组苏氨酸脱水酶的酶学性质测定

根据 Guillouet 等^[20]的方法测定苏氨酸脱水酶的活性。向反应体系内添加不同浓度 (5 ~ 50 mmol/L) *L*-苏氨酸, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法分析重组苏氨酸脱水酶的米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (v_{max})。分别于 pH 6 ~ 10 (30 $^{\circ}$ C) 以及 20 ~ 60 $^{\circ}$ C (pH 7.0) 测定重组苏氨酸脱水酶的相对酶活力, 考察其最适 pH 和最适温度。

1.2.5 摇瓶发酵

将构建的 α -酮丁酸和 *L*-异亮氨酸合成菌株接种

于含有 30 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中, 37 ℃、220 r/min 振荡培养至 $A_{600} = 10 \sim 12$ 。将 5 mL 种子培养液接种至含有 25 mL 发酵培养基的 500 mL 摇瓶中, 37 ℃、220 r/min 振荡培养 24 h。发酵培养 6 h 后 ($A_{600} = 5 \sim 8$), 加入 IPTG (终浓度为 0.1 mmol/L) 以诱导 *ilvA*、*ilvA*^{YI} 和 *ilvA*^M 转录。在发酵过程中, 依据指示剂苯酚红的颜色变化补充氨水 (体积分数为 25%), 使 pH = 7.0。待初始葡萄糖耗尽后, 加入葡萄糖溶液 (质量分数为 60%)。

1.2.6 产物和菌株生物量检测

采用高效液相色谱法测定 *L*-异亮氨酸和 α -酮丁酸浓度^[21]。以 $0.32A_{600} + 0.02$ 换算为 1 g/L 菌体 (以干质量计)^[22], 计算菌体生物量。

1.3 数据分析

酶学实验和发酵实验均设置 3 个平行样本, 重复 3 次。利用 GraphPad Prism 9 软件处理数据, 以

“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 *L*-异亮氨酸生产菌株 *C. glutamicum* YI 中苏氨酸脱水酶序列分析

工业微生物是获得抗反馈抑制突变体的重要来源。*L*-异亮氨酸生产菌株 *C. glutamicum* YI 由诱变筛选获得, 是工业生产中的主要菌株^[23]。由于苏氨酸脱水酶受严格的反馈抑制调节, 故推测 *C. glutamicum* YI 因该酶的反馈抑制作用被解除, 能够高效合成 *L*-异亮氨酸。基于此, 测定 *C. glutamicum* YI 苏氨酸脱水酶 TD^{YI} 编码基因 *ilvA*^{YI} 序列, 结果如图 2 所示。*ilvA*^{YI} 第 1 088 位的 C 突变为 T, 其编码的 TD^{YI} 第 363 位 *L*-脯氨酸突变为 *L*-亮氨酸 (P363L)。

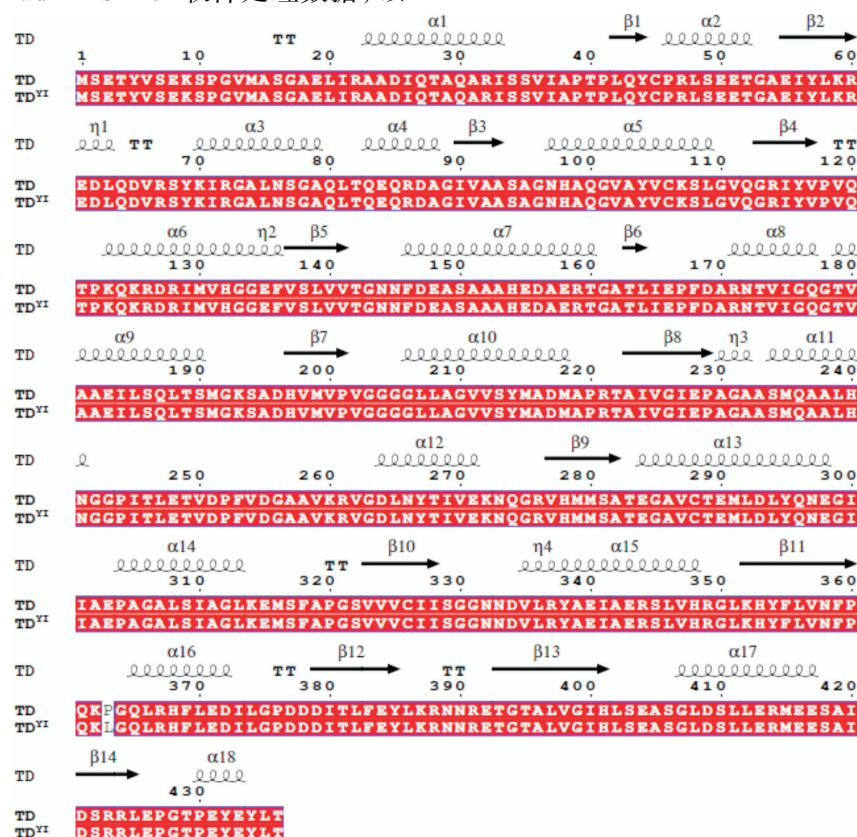


图 2 谷氨酸棒杆菌野生型 TD 和 TD^{YI} 氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acids sequence alignment of wild-type TD and TD^{YI} from *C. glutamicum*

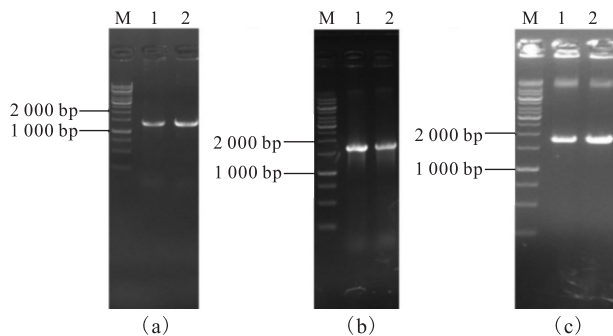
苏氨酸脱水酶的 C-端为调控结构域, 其第 350—436 位氨基酸起主要作用^[12]。当第 378 位 *L*-天冬氨酸突变为 *L*-甘氨酸时, 苏氨酸脱水酶的反馈抑制作用被解除^[24]。P363 位于 350—436 区域, 这是苏氨酸脱水酶的保守位点, 推测其突变影响了苏氨酸脱

水酶与 *L*-异亮氨酸的结合, 从而解除其反馈抑制^[25]。

2.2 苏氨酸脱水酶表达系统的构建

在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 表达 TD^{YI}, 以获得重组酶用于酶学性质研究 (以 *C. glutamicum* ATCC 13032 中野生型 TD 为对照)。片段、重组质粒及其重

组菌株的鉴定图谱如图 3 所示。以 *C. glutamicum* ATCC 13032 和 *C. glutamicum* YI 基因组为模板, 利用引物 *IA-1/IA-2* 分别扩增 TD 和 TD^{YI} 编码基因 *ilvA* 和 *ilvA*^{YI}, 获得碱基数约为 1 300 bp 的片段, 与实际碱基数 (1 311 bp) 一致 [图 3(a)]。



注: M. Marker; (a) *ilvA* 和 *ilvA*^{YI} 片段(图中 1 和 2); (b) 重组质粒 pET28a-*ilvA* 和 pET28a-*ilvA*^{YI} PCR 鉴定图谱(图中 1 和 2); (c) 重组菌株 *E. coli-ilvA* 和 *E. coli-ilvA*^{YI} 菌落 PCR 鉴定图谱(图中 1 和 2)。

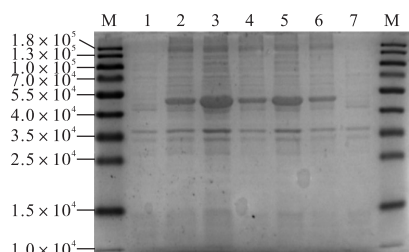
图 3 片段、重组质粒及其重组菌株的鉴定图谱

Fig. 3 Identification profiles of DNA fragments, recombinant plasmids and strains

分别将纯化后的 *ilvA* 和 *ilvA*^{YI} 产物与载体 pET28a 连接, 经转化、复苏、培养获得单菌落。经菌落 PCR 获得碱基数约为 1 600 bp 的条带, 与实际碱基数 (1 617 bp) 一致 [图 3(b)], 表明重组质粒构建成功, 分别命名为 pET28a-*ilvA* 和 pET28a-*ilvA*^{YI}。将上述质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经菌落 PCR 获得碱基数约为 1 600 bp 的条带, 与实际碱基数 (1 617 bp) 一致 [图 3(c)], 表明重组菌株构建成功, 分别命名为 *E. coli-ilvA* 和 *E. coli-ilvA*^{YI}。

2.3 重组苏氨酸脱水酶的表达与纯化

重组菌株 *E. coli-ilvA* 和 *E. coli-ilvA*^{YI} 经 IPTG 诱导培养及破碎后, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测, 结果如图 4 所示。



注: M. Marker; 1. *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a 的全细胞裂解物; 2—4. *E. coli-ilvA* 的全细胞裂解物、上清液和沉淀; 5—7. *E. coli-ilvA*^{YI} 的全细胞裂解物、上清液和沉淀。

图 4 TD 和 TD^{YI} 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of TD and TD^{YI}

与对照菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a 相比, *E.*

coli-ilvA 和 *E. coli-ilvA*^{YI} 全细胞裂解物、上清液和沉淀物中均有相对分子质量约为 4.6×10^4 的蛋白质表达, 与 TD 和 TD^{YI} 实际相对分子质量一致 (分别为 4.65×10^4 和 4.64×10^4), 表明来源于谷氨酸棒杆菌的苏氨酸脱水酶均能够在大肠杆菌中可溶性表达。全细胞裂解物上清液经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化、透析、浓缩后, 获得重组蛋白 TD 和 TD^{YI}, 其质量浓度分别为 2.4、2.2 mg/mL。

2.4 重组苏氨酸脱水酶动力学参数

重组 TD 和 TD^{YI} 的动力学分析如图 5 所示。底物浓度 [S] 用符号 *c* (单位为 mmol/L) 表示, 重组 TD 和 TD^{YI} 酶促反应动力学方程为 $1/v = 0.093/c + 0.011$ 和 $1/v = 0.099/c + 0.011$ 。重组 TD 和 TD^{YI} 的 K_m 分别为 8.5、8.7 mmol/L, 表明二者对底物 *L*-苏氨酸亲和性无显著差异; v_{max} 、催化常数 (K_{cat}) 及 K_{cat}/K_m 亦无显著差异, 分别为 $91.5 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 和 $88.2 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 、 9.7 s^{-1} 和 9.2 s^{-1} 、 $1.14 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{s})$ 和 $1.06 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{s})$ 。因此, P363L 突变并未影响 TD^{YI} 的催化性能。

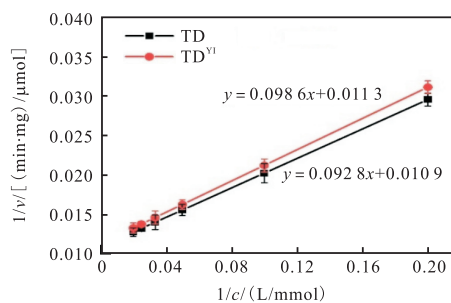
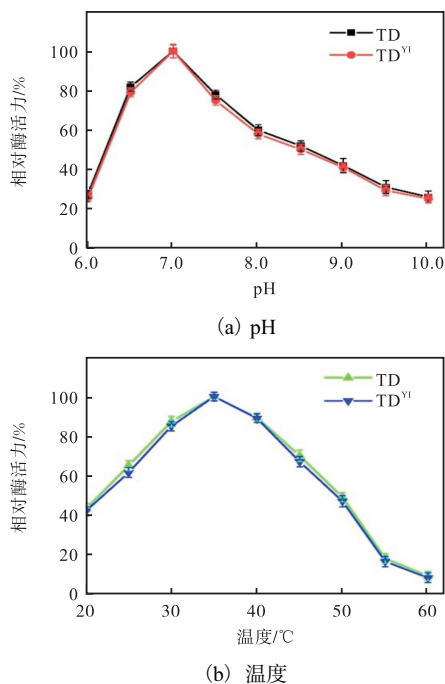


图 5 重组 TD 和 TD^{YI} 的动力学分析

Fig. 5 Kinetic analysis of recombinant TD and TD^{YI}

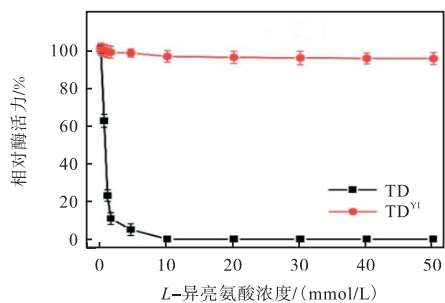
2.5 重组苏氨酸脱水酶最适 pH 及其温度

为进一步考察 P363L 突变对重组苏氨酸脱水酶的影响, 测定其最适 pH 和温度, 结果如图 6 所示。重组 TD^{YI} 在 pH 7.0 时相对酶活力最高, 且在 pH 6.5 ~ 7.5 范围内相对酶活力均维持在较高水平 (不低于 70%)。在 pH 6.0 ~ 7.0 范围内, 重组 TD^{YI} 相对酶活力随 pH 的升高而升高, 然而在 pH 高于 7.0 时, 随 pH 的升高而逐渐降低, 与重组 TD 的变化趋势一致。重组 TD^{YI} 的相对酶活力在温度为 35 °C 时最高, 且在 30 ~ 40 °C 范围内不低于 85%。在 20 ~ 35 °C 范围内, 重组 TD^{YI} 的相对酶活力随温度的升高而升高, 在高于 35 °C 时随温度的升高而逐渐降低, 与重组 TD 的变化趋势一致。因此, P363L 突变对最适 pH 和最适温度无显著影响。

图6 pH和温度对重组TD和TD^{YI}活性的影响Fig. 6 Effects of pH and temperature on the activity of recombinant TD and TD^{YI}

2.6 重组TD^{YI}抗反馈抑制作用特性分析

为考察重组TD^{YI}抗L-异亮氨酸反馈抑制特性,在不同浓度(0~50 mmol/L)L-异亮氨酸条件下测定其活性(以*C. glutamicum* ATCC 13032 TD为对照),结果如图7所示。

图7 不同浓度L-异亮氨酸对重组TD和TD^{YI}活性的影响Fig. 7 Effects of different *L*-isoleucine concentrations on the activities of recombinant TD and TD^{YI}

野生型TD相对酶活力随L-异亮氨酸浓度增加而急剧下降,在4.5 mmol/L L-异亮氨酸条件下,相对酶活力仅剩5%;L-异亮氨酸浓度高于10 mmol/L时,丧失活性。与重组TD不同,随着L-异亮氨酸浓度的增加,重组TD^{YI}的相对酶活力无明显变化;当L-异亮氨酸浓度为50 mmol/L时,TD^{YI}仍具有95%的相对酶活力,表明TD^{YI}解除了L-异亮氨酸的反馈抑制。Morbach等^[13]的研究结果表明,苏氨酸脱水酶突变体TD^{V323A}在10 mmol/L L-异亮氨酸条件下的

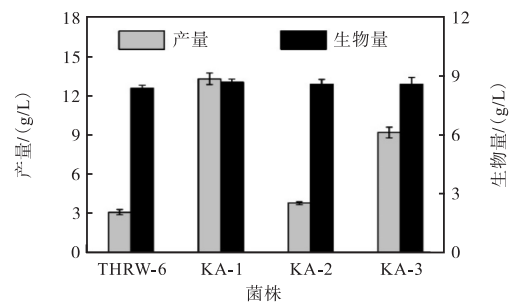
相对酶活力未见明显变化,但在50 mmol/L L-异亮氨酸条件下,其相对酶活力降低78%。由此可见,TD^{YI}的抗反馈抑制性能更佳。

2.7 TD^{YI}在 α -酮丁酸和L-异亮氨酸合成中的应用

2.7.1 TD^{YI}对 α -酮丁酸合成的影响

苏氨酸脱水酶对 α -酮丁酸和L-异亮氨酸的合成至关重要^[26-27]。为进一步考察TD^{YI}的性能,将其应用于 α -酮丁酸和L-异亮氨酸的生物合成。

将TD^{YI}编码基因*ilvA*^{YI}连接至质粒pTrc99a并转化至菌株THRW-6中,获得菌株KA-1。为考察TD^{YI}的性能,分别将谷氨酸棒杆菌野生型*ilvA*和大肠杆菌中解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶(TD^M)突变体编码基因*ilvA*^{C1339T/G1341T/C1351G/T1352C}(*ilvA*^M)^[28]转化至菌株THRW-6中,获得菌株KA-2和KA-3。摇瓶发酵结果表明,KA-1、KA-2和KA-3的生物量分别为8.7、8.4、8.6 g/L,与出发菌株THRW-6(8.4 g/L)无明显差异,这表明过表达3种*ilvA*对菌体生长无明显影响(图8),三者的 α -酮丁酸产量分别为13.3、3.8、9.2 g/L,均高于出发菌株THRW-6(3.1 g/L)。KA-1的合成性能明显高于KA-2和KA-3,表明TD^{YI}对 α -酮丁酸合成的促进作用优于野生型TD和大肠杆菌TD^M(图8)。由于THRW-6基因组中合成L-异亮氨酸的相关基因*ilvIH*和*ilvBN*被敲除,需在培养基中添加L-异亮氨酸,其对野生型TD具有反馈抑制作用,故KA-2的 α -酮丁酸产量远低于KA-1和KA-3。

图8 过表达*ilvA*及其突变体对 α -酮丁酸合成的影响Fig. 8 Effect of overexpression of *ilvA* and its mutants on α -ketobutyrate synthesis

2.7.2 TD^{YI}对L-异亮氨酸合成的影响

过表达解除L-异亮氨酸反馈抑制的苏氨酸脱水酶突变体有利于L-异亮氨酸合成^[30-31]。Yin等^[17]在L-异亮氨酸生产菌株*C. glutamicum* JHI3-156中过表达抗反馈抑制的突变体*ilvA*^{T1147G},菌株JHI3-156/pDXW-8-*ilvA*^{T1147G}的L-异亮氨酸产量较出发菌株提高9.5%。为考察*ilvA*^{YI}对L-异亮氨酸合成的影响,

在 *L*-异亮氨酸合成菌株 Ile-01 中过表达 *ilvA*^{YI}, 以谷氨酸棒杆菌野生型 *ilvA* 和大肠杆菌中 *ilvA*^M 为对照, 分别获得菌株 ISO-1、ISO-2 和 ISO-3。过表达 *ilvA* 及其突变体对 *L*-异亮氨酸合成的影响如图 9 所示。上述 3 种菌株的生物量(分别为 14.3 g/L、14.4 g/L 和 14.3 g/L)与 Ile-01 (14.4 g/L) 无明显差异, 表明过表达 3 种 *ilvA* 对菌株生长无显著影响。

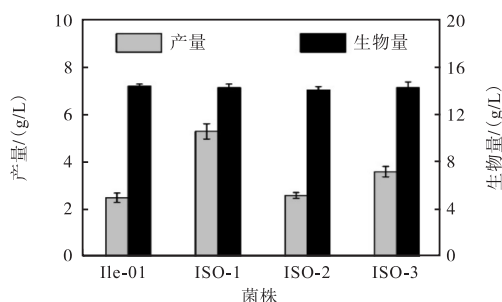


图 9 过表达 *ilvA* 及其突变体对 *L*-异亮氨酸合成的影响
Fig. 9 Effect of the overexpression of *ilvA* and its mutants on *L*-isoleucine synthesis

菌株 ISO-1 的 *L*-异亮氨酸产量为 5.3 g/L, 较菌株 Ile-01 (2.5 g/L) 提高 112%, 而表达野生型 *ilvA* 对 *L*-异亮氨酸产量无明显影响 (ISO-2, 2.6 g/L), 该结果证实解除苏氨酸脱水酶反馈抑制作用可有效促进 *L*-异亮氨酸合成。ISO-1 的 *L*-异亮氨酸产量较 ISO-3 (3.6 g/L) 高 47.2%, 这说明 TD^{YI} 对 *L*-异亮氨酸合成的促进作用优于大肠杆菌 TD^M。检测 ISO-1 和 ISO-3 胞内 TD 活性, 发现 TD^{YI} 较 TD^M 高 48.7%, 分别为 0.58、0.39 μmol/(min·mg), 进一步证明 TD^{YI} 性能优于 TD^M。

3 结 论

本研究发现 *L*-异亮氨酸生产菌株 *C. glutamicum* YI 中苏氨酸脱水酶第 363 位 *L*-脯氨酸突变为 *L*-亮氨酸 (P363L)。与野生型 TD 相比, TD^{YI} 的动力学参数、最适 pH 和温度均未见明显变化, 表明 P363L 突变未影响其催化性能。TD^{YI} 解除了 *L*-异亮氨酸的反馈抑制作用, 在 50 mmol/L *L*-异亮氨酸条件下, 仍具有 95% 相对酶活力。将 TD^{YI} 分别应用于 α-酮丁酸和 *L*-异亮氨酸合成, 使其产量分别增加至 13.3 g/L 和 5.3 g/L, 且效果优于野生型 TD 和大肠杆菌 TD^M。该研究结果可为 α-酮丁酸、*L*-异亮氨酸及其相关产物的生物合成提供参考。

本研究从 *L*-异亮氨酸生产菌株 *C. glutamicum* YI 中挖掘出解除 *L*-异亮氨酸反馈抑制的 TD^{YI}, 但其

机制尚不明晰。后续研究将聚焦于 P363L 突变对 TD^{YI} 酶分子结构及性能的影响, 包括利用分子对接和动力学模拟考察该突变对其空间构象和稳定性的影响; 对 P363 进一步饱和突变, 考察该位点氨基酸对其分子结构、酶学特性及与底物和产物相互作用的影响, 明确其构效关系, 从而解析其解除 *L*-异亮氨酸反馈抑制作用的机制。

参考文献:

- [1] ZHAO G H, ZHANG D Z, ZHOU B Z, et al. Fine-regulating the carbon flux of *L*-isoleucine producing *Corynebacterium glutamicum* WM001 for efficient *L*-threonine production[J]. ACS Synthetic biology, 2024, 13(10): 3446–3460.
- [2] 于雪飞, 尹良鸿, 李焱, 等. 细菌苏氨酸脱水酶受 *L*-异亮氨酸反馈抑制的关键在于其调控结构域[J]. 工业微生物, 2014, 44(5): 1–6.
- [3] GALLAGHER D T, GILLILAND G L, XIAO G Y, et al. Structure and control of pyridoxal phosphate dependent allosteric threonine deaminase[J]. Structure, 1998, 6(4): 465–475.
- [4] YU S Z, ZHENG B, CHEN Z Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids[J]. Microbial cell factories, 2021, 20: 230–231.
- [5] WENDISCH V F. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production[J]. Metabolic engineering, 2020, 58: 17–34.
- [6] 刘小溪, 张戣, 张勇, 等. 一种苏氨酸脱氨酶突变体及其在异亮氨酸制备中的应用: 202211375895.8[P]. 2024-05-07.
- [7] YU X F, LI Y Y, WANG X Y. The role of ACT-like subdomain in bacterial threonine dehydratases[J]. Plos one, 2014, 9: e87550.
- [8] LE T, BASSEY B F, VO T P N, et al. Achieving high titer and yield in the bioconversion of *L*-threonine to 2-hydroxybutyric acid with *Escherichia coli* BL21[J]. Systems microbiology and biomanufacturing, 2023, 4(2): 708–715.
- [9] MÖCKEL B, EGGELING L, SAHM H. Functional and structural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of bacteriology, 1992, 174(24): 8065–8072.
- [10] UMBARGER H E. Evidence for a negative-feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine[J]. Science,

- 1956, 123: 848–849.
- [11] GUO Y F, XU J Z, HAN M, et al. Generation of mutant threonine dehydratase and its effects on *L*-isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. World journal of microbiology and biotechnology, 2015, 31 (9): 1369–1377.
 - [12] MÖCKEL B, EGGELING L, SAHM H. Threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* with altered allosteric control: their generation and biochemical and structural analysis[J]. Molecular microbiology, 1994, 13 (5): 833–842.
 - [13] MORBACH S, SAHM H, EGGELING L. Use of feedback-resistant threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* to increase carbon flux towards *L*-isoleucine[J]. Applied and environmental microbiology, 1995, 61 (12): 4315–4320.
 - [14] MA Y C, CHEN Q X, CUI Y, et al. Comparative genomic and genetic functional analysis of industrial *L*-leucine and *L*-valine-producing *Corynebacterium glutamicum* strains[J]. Journal of microbiology and biotechnology, 2018, 28 (11): 1916–1927.
 - [15] 李燕军, 张海宾, 麻杰, 等. 代谢工程改造大肠杆菌合成 *L*-异亮氨酸的研究[J]. 发酵科技通讯, 2016, 45 (3): 133–139.
 - [16] VOGT M, KRUMBACH K, BANG W, et al. The contest for precursors: channelling *L*-isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* without byproduct formation[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2015, 99 (2): 791–800.
 - [17] YIN L H, HU X P, XU D Q, et al. Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase *L*-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic engineering, 2012, 14 (5): 542–550.
 - [18] 金径林, 李任相, 金希英, 等. 新的 *L*-苏氨酸脱水酶变体及使用其生产 *L*-异亮氨酸的方法: 202180003186.4 [P]. 2024–04–09.
 - [19] 孟刚, 杨立鹏, 魏爱英, 等. 苏氨酸脱水酶基因突变体及其应用: 202310699284.7 [P]. 2023–09–05.
 - [20] GUILLOUET S, RODAL A A, AN G H, et al. Expression of the *Escherichia coli* catabolic threonine dehydratase in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on isoleucine production[J]. Applied & environmental microbiology, 1999, 65 (7): 3100–3107.
 - [21] DING X H, YANG W J, DU X B, et al. High-level and -yield production of *L*-leucine in engineered *Escherichia coli* by multistep metabolic engineering[J]. Metabolic engineering, 2023, 78: 128–136.
 - [22] WEI M H, LI G R, XIE H X, et al. Sustainable production of 4-hydroxyisoleucine with minimised carbon loss by simultaneously utilising glucose and xylose in engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource technology, 2022, 354: 127196.
 - [23] 朱福周, 芦楠, 李宇虹. 增强回补途径对谷氨酸棒状杆菌合成 *L*-异亮氨酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46 (2): 11–17.
 - [24] 张科春, 黄浩, 王靖宇, 等. 优化苏氨酸脱水酶或脱水酶表达提高 *L*-异亮氨酸产量的方法: 202310586168.4 [P]. 2024–03–26.
 - [25] 张晓云, 吴涛, 栾明月, 等. 苏氨酸脱水酶突变体、产支链氨基酸的重组微生物及其应用: 202110998231.6 [P]. 2023–12–05.
 - [26] ZHANG H J, YE T, LIU F M, et al. Strategies to enhance *L*-isoleucine synthesis by modifying the threonine metabolism pathway in *Escherichia coli*[J]. ACS Omega, 2024, 9 (9): 10276–10285.
 - [27] WU M Y, SUN Y, ZHU M R, et al. Molecular dynamics-based allosteric prediction method to design key residues in threonine dehydrogenase for amino-acid production[J]. ACS Omega, 2021, 6 (16): 10975–10983.
 - [28] PARK J H, OH J E, LEE K H, et al. Rational design of *Escherichia coli* for *L*-isoleucine production[J]. ACS Synthetic biology, 2012, 1 (11): 532–540.
 - [29] LIU J H, LIU J, LI J J, et al. Reconstruction the feedback regulation of amino acid metabolism to develop a non-auxotrophic *L*-threonine producing *Corynebacterium glutamicum*[J]. Bioresources and bioprocessing, 2024, 11: 43–45.
 - [30] 谭海, 顾阳, 卢南巡, 等. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌促进 *L*-异亮氨酸发酵合成的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40 (9): 1–6.
 - [31] WANG X Y. Strategy for improving *L*-isoleucine production efficiency in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2019, 103 (5): 2101–2111.

责任编辑: 郎婧