

林伟朝, 孙雯, 孙晓萱, 等. 重组枯草芽孢杆菌全细胞催化生成 L-酪氨酸 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(22): 116–123. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120110

LIN Weichao, SUN Wen, SUN Xiaoxuan, et al. Whole-cell Catalyzed Production of L-tyrosine in Recombinant *Bacillus subtilis*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(22): 116–123. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120110

· 生物工程 ·

重组枯草芽孢杆菌全细胞催化生成 L-酪氨酸

林伟朝^{1,2}, 孙雯^{1,2}, 孙晓萱^{1,2}, 朱显峰^{1,*}, 张保国^{2,*}

(1.河南大学生命科学学院, 微生物研究所, 河南开封 475000;

2.中国科学院上海高等研究院, 上海 201210)

摘要:目的: 本研究构建一株重组枯草芽孢杆菌工程菌, 实现以苯酚、丙酮酸和氨为底物全细胞生成 L-酪氨酸 (L-tyrosine, L-Tyr), 并优化其细胞培养条件和催化反应条件, 以期提高 L-Tyr 的产量。方法: 将来源于 *Pantoea agglomerans* 的酪氨酸酚裂解酶 (Tyrosine Phenol-Lyase, TPL) 经密码子优化后在枯草芽孢杆菌中异源表达, 通过单因素实验优化了重组菌诱导表达条件和全细胞转化条件, 旨在提高 L-Tyr 产量。结果: 重组枯草芽孢杆菌在 20 °C, 2.0 g/L 木糖诱导培养 36 h 时 TPL 活性最高达到 $4.65 \pm 0.15 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 在 75 mmol/L 苯酚、75 mmol/L 丙酮酸钠、487 mmol/L 氯化铵、2.0 g/L 亚硫酸钠、2.0 g/L EDTA、0.08 g/L 磷酸吡哆醛 (Pyridoxal Phosphat, PLP)、湿菌体 50 g/L、pH=8.0、35 °C 的全细胞转化条件下, L-Tyr 达到 9.38 g/L, 转化率为 73.24%。为了进一步改善高浓度苯酚导致 TPL 酶活力下降问题, 在全细胞转化环节采用分批补料方式, 20 h 后得到 15.12 g/L L-Tyr, 转化率为 75.51%。结论: 研究结果表明重组枯草芽孢杆菌可以成功转化苯酚、丙酮酸钠合成 L-酪氨酸, 为全细胞生物制备食品级 L-酪氨酸提供了理论和技术基础, 具有良好的应用前景。

关键词: L-酪氨酸, 枯草芽孢杆菌, 酪氨酸酚裂解酶, 全细胞催化

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)22-0116-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120110

本文网刊:



Whole-cell Catalyzed Production of L-tyrosine in Recombinant *Bacillus subtilis*

LIN Weichao^{1,2}, SUN Wen^{1,2}, SUN Xiaoxuan^{1,2}, ZHU Xianfeng^{1,*}, ZHANG Baoguo^{2,*}

(1. Institute of Microbial Engineering, School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475000, China;

2. Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China)

Abstract: Objective: This study conducted a recombinant *Bacillus subtilis* strain capable of producing L-Tyr utilizing phenol, sodium pyruvate, and ammonia. Moreover, the conditions of cell culture and catalytic reaction were optimized to improve L-Tyr production. Methods: The tyrosine phenol-lyase (TPL) gene from *Pantoea agglomerans* was codon-optimized and successfully over-expressed in *B. subtilis*. The conditions of induction and whole-cell transformation were optimized using single-factor experiments for L-Tyr production. Results: The highest TPL enzyme activity was achieved $4.65 \pm 0.15 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ in the recombinant *B. subtilis* at 20 °C with 2.0 g/L xylose after 36 hours. Under the whole-cell transformation conditions of 75 mmol/L phenol, 75 mmol/L sodium pyruvate, 487 mmol/L ammonium chloride, 2.0 g/L sodium sulfite, 2.0 g/L EDTA, 0.08 g/L pyridoxal phosphate (PLP), wet cell mass of 50 g/L, pH8, and 35 °C, the L-Tyr production increased to 9.38 g/L with a conversion rate of 73.24%. Coping with the issue of decreased TPL enzyme activity caused by phenol resistance, a batch feeding strategy was implemented during the whole-cell transformation, resulting in a final L-Tyr production of 15.12 g/L with a conversion rate of 75.51% after 20 hours. Conclusion: These findings

收稿日期: 2023-12-13

基金项目: 福建省中科院 STS 重大项目 (2022T3004)。

作者简介: 林伟朝 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品和药用微生物, E-mail: linwc@sari.ac.cn。

* 通信作者: 朱显峰 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品和药用微生物, E-mail: zhuxf73@163.com。

张保国 (1977-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物代谢与调控, E-mail: zhangbg@sari.ac.cn。

demonstrate the successful conversion of phenol and sodium pyruvate into L-Tyr by the recombinant *B. subtilis* strain. The study would provide a theoretical and technical foundation for the production of food-grade L-Tyr using whole-cell biocatalysis, highlighting its potential for practical applications.

Key words: L-tyrosine; *B. subtilis*; tyrosine phenol-lyase; whole-cell catalysis

L-酪氨酸(L-tyrosine, L-Tyr)是一种酚羟基 α -芳香族氨基酸,在体内由苯丙氨酸羟基化生成^[1],可以在动植物和微生物中从头合成,属于半必需氨基酸,又是许多蛋白质合成的前体物质,所以也属于营养必需氨基酸^[2]。L-Tyr 对内分泌激素具有调节作用,它是多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素以及甲状腺素等激素^[3]生物合成的前体,当人们长期处在压力的情况下,补充酪氨酸被认为可以增加这些激素的水平,从而改善压力状况下的记忆力和表现,因此,L-Tyr 可用作膳食补充剂^[4]。此外,吴梦迪^[5]的研究证实了 L-Tyr 和血红素混合物在有氧条件下具有协同抗氧化作用,这表明 L-Tyr 在抗氧化和抗衰老化妆品领域具有重要的应用价值。L-酪氨酸还可以作为酪醇^[6]、左旋多巴^[7]、香豆素^[8]的合成中间体,而酪醇、左旋多巴和香豆素则是保健品和香料的主要成分^[9]。

目前,国内外 L-Tyr 的生产仍然依靠从天然蛋白质中提取制得,即利用天然蛋白资源为原料,将其进行水解、浓缩、结晶、脱色等步骤的处理,分离提取 L-Tyr,蛋白质水解法存在着生产原料有限、产品和工艺复杂、污染严重等缺点^[10]。除了蛋白质水解法,L-Tyr 的生产方式还包括化学合成法、发酵法和酶催化法。其中化学合成法制备的产物为外消旋的 DL-酪氨酸,须进一步拆分。化学合成法的工艺流程复杂、效率低,一般不适用工业生产^[11-12]。发酵法是指以生物质碳源为原料,通过优良的微生物菌种在合适的条件下发酵来累积 L-酪氨酸,在 Ping 等^[13]的研究中,通过调控大肠杆菌代谢途径和关键酶的表达,成功将碳通量导向莽草酸途径。再经过 48 h 的培养后得到 7.11 g/L 的 L-Tyr。也有人尝试对谷氨酸棒杆菌进行代谢改造,使其碳通量更多地向 L-酪氨酸的方向进行,实现可再生碳源生产 L-Tyr,也只得到 3.1 g/L L-Tyr^[14],发酵法生产的 L-Tyr 产量不高,不具备工业应用价值。酶催化法是指利用微生物细胞内酪氨酸酚裂解酶将苯酚、丙酮酸和氨转化为 L-酪氨酸^[15],反应方程式如图 1 所示。该方法绿色环保、对环境无污染且反应条件温和、便于操作,但也存在

酶稳定性差、活性不高的问题。所以常俊俊等^[16]在大肠杆菌中表达 TPL 后,用生物全细胞代替酶分子,通过全细胞转化的方式得到 16.17 g/L L-Tyr。而 Xu 等^[17]先筛选出催化性能优异的 TPL 并在大肠杆菌内表达,再通过底物分批补料获得了 48.5 g/L 的 L-Tyr。Li 等^[18]也将 L-乳酸氧化酶和 TPL 在大肠杆菌中共表达制备 L-酪氨酸及其类似物。相较于其他方法酶催化法可以大规模制备 L-Tyr,也更符合绿色发展的理念,在未来 L-Tyr 生产市场有良好前景。目前,生物酶法生产 L-Tyr 的研究都集中于大肠杆菌,大肠杆菌基因表达体系的调控机理研究透彻,培养物廉价。但大肠杆菌作为 L-酪氨酸的生产工程菌存在着噬菌体污染和内毒素^[19]等安全问题,这都将限制酶催化法制得的 L-Tyr 在食品、医药领域的应用。

枯草芽孢杆菌是一种公认安全的、可用于食品工业领域的食品安全生产菌株。枯草芽孢杆菌异源表达系统有许多优点,如易于遗传操作、在廉价底物上的高生长率以及发酵周期短等。该表达系统已经被广泛接受并应用于各种化学品、药品、食品、蛋白质和酶的生产^[20]。本研究将来源于 *Pantoea agglomerans* 的酪氨酸酚裂解酶(GenBank: AAB24234.1)在枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*164T7P 中克隆表达^[21],构建重组菌株 *B. subtilis*164T7P-pMK4T7/TPL。将重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*164T7P-pMK4T7/TPL 作为全细胞催化剂转化丙酮酸、苯酚和氨生成 L-酪氨酸。同时为了提高 L-Tyr 的产量对诱导培养条件和全细胞转化条件进行研究。这是首次将枯草芽孢杆菌全细胞转化方式应用于 L-Tyr 的生产,为后续重组枯草芽孢杆菌全细胞生物催化制备 L-酪氨酸的工业化应用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*164T7P、质粒 pMK4-T7^[21]、质粒 pET-28a(+)/TPL 为实验室保藏;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、高保真酶 2 x phanta Master Mix、同源重组试剂盒 诺唯赞生物科技(南京)股份

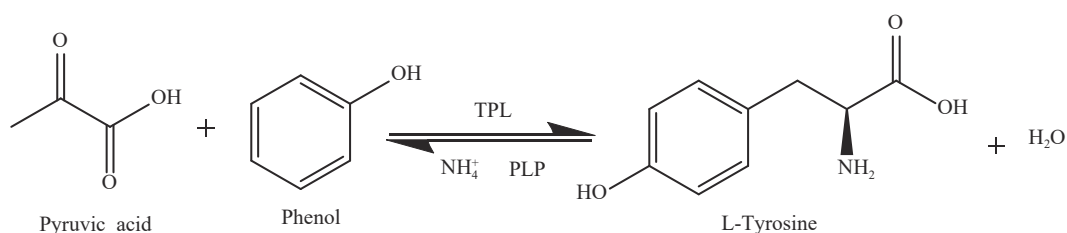


图 1 酪氨酸酚裂解酶催化合成 L-酪氨酸

Fig.1 Catalytic synthesis of L-Tyr by tyrosine phenol-lyase

有限公司; 限制性核酸内切酶 TaKaRa 公司; Axy-Prep™ Plasmid Miniprep Kit、AxyPrep PCR™ Cleanup Kit 爱思进生物技术(杭州)有限公司; 改良型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 生工(上海)生物股份有限公司; 苯酚、丙酮酸钠、D-木糖、磷酸吡哆醛、亚硫酸钠、氯化铵、乙二胺四乙酸(EDTA)、考马斯亮蓝 R-250 麦克林生化科技(上海)有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠 泰坦科技(上海)股份有限公司; L-酪氨酸 分析纯, 索莱宝科技(北京)有限公司。

DK-8D 型三孔电热恒温水浴锅 上海飞域实业国际贸易有限公司; EPS-100 核酸电泳仪 上海天能科技有限公司; H1750R 高速台式冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; GET3XG 基因扩增仪 杭州柏恒科技有限公司; LC-20A 高效液相色谱仪 Shimadzu(日本)公司; MLS-3780 高压蒸汽灭菌器 SANYO(日本)公司; ZQZY-78BES 振荡培养箱 上海知楚仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 枯草芽孢杆菌培养基和发酵培养基均为 LB 培养基, 其组分为 5.0 g/L 酵母粉、10 g/L 蛋白胨、10 g/L 氯化钠, 双蒸水溶解, 固体培养基在其基础上添加 2% 琼脂粉。

1.2.2 引物设计 以保藏的质粒 pET-28a(+)/TPL 为 PCR 模板, T7 和 T7t 为引物, PCR 扩增。PCR 反应条件如下: 95 ℃ 预变性 5 min, 循环 1 次; 95 ℃ 变性 15 s, 循环 30 次; 55 ℃ 退火 15 s, 循环 30 次; 72 ℃ 延伸 30 次, 2 kb/min; 最后 72 ℃ 延伸 3 min, 循环 1 次; 16 ℃ 循环 1 次。将扩增产物送至上海杰李生物技术有限公司测序后进行 Blast 序列比对。根据比对结果显示的基因组信息, 选择 EcoR I、BamH I 为酶切位点, 设计并合成一对带有同源臂引物 pMK4-TPL-F/pMK4-TPL-R, 序列参考表 1。

表 1 本研究中用到的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')	大小(bp)
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19
pMK4-TPL-F	GAAAGGAGGATATACCGGATCCATGAAC ATCCTGCCGAGCCT	43
pMK4-TPL-R	CGGGCTTTGTTAGCAGGAATTCTTAAATA AAGTCAAACGCGCAG	45
T7N-TesF	GTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAG	26
T7N-TesR	GTACTGAGAGTGCACCATATGATCCG	26

注: 酶切位点用下划线表示。

1.2.3 构建重组表达菌株 以质粒 pET-28a(+)/TPL 为模板, pMK4-TPL-F 和 pMK4-TPL-R 为引物, PCR 扩增。将质粒 pMK4-T7 用限制性内切酶 EcoR I/BamH I 切割。酶切产物和 PCR 产物都用 AxyPrep PCR™ 清洁试剂盒纯化回收 DNA。然后按照同源重组试剂盒说明方法进行一步克隆连接。将连接产

物转入 *E. coil* DH5 α 感受态细胞, 涂布于 100 mg/L 氨苄抗性平板。37 ℃ 恒温培养过夜, *E. coil* DH5 α 感受态细胞转化方式参考萨姆布鲁克^[22]的方法。用引物 T7N-TesF/T7N-TesR 对阳性转化子 PCR 验证, PCR 结果送至上海杰李测序生物技术有限公司, 以验证重组质粒 pMK4-T7/TPL 是否成功构建。挑取测序结果正确的菌株提取质粒 pMK4-T7/TPL, 转入 *B. subtilis*164T7P 感受态中, 涂布于 100 mg/L 氯霉素抗性平板, 37 ℃ 过夜培养, *B. subtilis*164T7P 感受态细胞的制备和转化方式参考 Ji 等^[21]的方法。重新挑取阳性转化子进行 PCR 验证, 验证结果送至上海杰李生物技术有限公司, 将测序结果正确的重组菌株 *B. subtilis*164T7P-pMK4-T7/TPL 命名为 KC-TPL。

1.2.4 重组菌诱导培养及表达验证 选择原始表达菌株 *B. subtilis*164T7P、空白质粒对照菌株 *B. subtilis*164T7P-pMK4-T7 和诱导表达菌株 KC-TPL 同时进行诱导表达验证, 具体步骤如下。

1.2.4.1 菌体培养 将 *B. subtilis*164T7P、*B. subtilis*164T7P-pMK4-T7、KC-TPL 划线, 挑取单克隆于 3 mL 的试管 LB 中, 放在 37 ℃ 恒温振荡培养箱、200 r/min 培养 10~11 h。以 1%(V/V)的接种量转接 100 mL LB 培养基中, 当 OD₆₀₀ 达到 0.8~1.0 后, 加入终浓度为 1 g/L 的 D-木糖诱导, 接着在 37 ℃、200 r/min 培养箱中诱导培养 24 h, 培养结束后 4 ℃、8000 r/min 离心 5 min 收集菌体。

1.2.4.2 菌体破碎及电泳条件 KC-TPL 的破碎方法参照梁栋等^[23]的报道。在破碎细菌之前, 需要进行三次反复冻融以提高破碎效率。冻融完成后, 将样品以 5000 r/min 的速度离心 30 min, 取得沉淀后用 1 mol/L pH7.0 的 HEPES 缓冲液重悬。整个破碎过程需要在冰浴条件下进行, 超声破碎参数为: 超声 3 s, 间隔 5 s, 共进行 4 次 20 min, 功率为 130 W。破碎完成后, 样品以 12000 r/min 的速度在 4 ℃ 离心 30 min。上清液使用生工改良型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度并将其稀释至相同浓度。将上清液与蛋白上样缓冲液混合后加热 5 min, 每孔添加 10 μ L 样品到 12% 分离胶和 5% 浓缩胶中。电泳条件为先 90 V 运行 20 min, 然后切换到 160 V 电泳 100 min。电泳结束后使用考马斯亮蓝溶液染色 1 h, 随后使用脱色液进行过夜处理。

1.2.5 酶活测定 TPL 酶活力测定参照陈明亮等^[24]报道的方法进行。取 0.1 g KC-TPL 湿菌体, 加入 10 mL 反应体系: 丙酮酸钠质量分数 1%, 苯酚质量分数 1%, 0.125 g/L PLP, 氨水调 pH7.4, 温度为 30 ℃, 200 r/min 条件下进行酶促反应, 30 min 后用浓盐酸终止酶促反应, 利用高效液相色谱法(HPLC)检测反应液中 L-Tyr 的浓度。酶活定义为在上述条件下每分钟内催化生成 1 μ mol L-酪氨酸所需要的酶量为—

个酶活单位(U)。

HPLC 检测条件为: 色谱柱 Agilent C₁₈ 柱(4.6×250 nm, 5 μm); 流动相 V(8.5 mmol/L 乙酸钠溶液(磷酸调至 pH=4)):V(甲醇)=4:1; 紫外检测波长为 230 nm; 流速 0.6 mL/min; 进样量 20 μL; 柱温为室温^[25]。

$$\text{每克湿菌体所含酶活单位数为: } A(U) = \frac{n}{T \times m}$$

式中: n 为反应结束时反应液中 L-Tyr 的微摩尔数, μmol; T 为反应时间, min; m 为加入反应体系中湿菌体量, g;

1.2.6 酪氨酸酚裂解酶在枯草芽孢杆菌中表达优化

在木糖诱导阶段, 选取对 TPL 表达影响较大的因素进行研究, 分别是培养温度(20~40 ℃)、培养时间(12~60 h)和诱导剂浓度(0.5~2.5 g/L)。

1.2.7 全细胞转化合成 L-酪氨酸反应体系建立及优化

将发酵 24 h 后的菌体离心收集菌体, 冷藏 16~24 h 后在 37 ℃ 摇床用 1.0 g/L 的 CTAB 处理 1 h 后洗涤两次放 -20 ℃ 备用。全细胞转化反应体系(10 mL): 将 100 mmol/L 苯酚、100 mmol/L 丙酮酸钠、650 mmol/L 氯化铵、2.0 g/L Na₂SO₃、2.0 g/L EDTA、0.125 g/L PLP 和 50 g/L KC-TPL 湿细胞投入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中, 反应条件: T=30 ℃、pH=7.4, 反应 10 h 后加入 1.0 mol/L NaOH 溶解沉淀, 用 HPLC 检测反应液中 L-Tyr 的含量。全细胞转化阶段优化方案: 苯酚毒性浓度(25~150 mmol/L)、湿细胞浓度(20~70 g/L)、反应温度(20~45 ℃)、反应初始 pH(6~9)和最佳 PLP 浓度(0.06~0.14 g/L)。

1.3 数据处理

所有实验重复 3 次, 液相数据导出后采用 Excel 2019 进行数据统计, 利用 IBM SPSS 25 的单因素方差分析中的沃勒-邓肯多重比较进行显著性分析($P < 0.05$), 用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 重组枯草芽孢杆菌 KC-TPL 的鉴定

按照方法 1.2.2 所述方法扩增出 TPL 基因片段, Blast 结果显示酪氨酸酚裂解酶长度为 1371 bp, 将 TPL 片段插入到 pMK4-T7 载体的 EcoR I、BamH I 酶切位点之间, 得到质粒 pMK4-T7/TPL, 如图 2 所示。同时以未异源表达 TPL 基因的质粒 pMK4-T7 为对照, 分别转化至 *B. subtilis*164T7P 中表达, 核酸电泳结果如图 3A 所示, 重组枯草芽孢杆菌特异性条带位置和片段大小相同, 测序结果也显示未发生突变。接着将 *B. subtilis*164T7P、*B. subtilis*164T7P-pMK4-T7、KC-TPL 按照方法 1.2.4 诱导和破碎, SDS-PAGE 结果如图 3B 所示, 与空白对照相比, 重组菌在 50 kDa 位置有明显的特异性蛋白条带, 与理论值基本一致, 表明 TPL 基因在 *B. subtilis*164T7P 中成功表达。

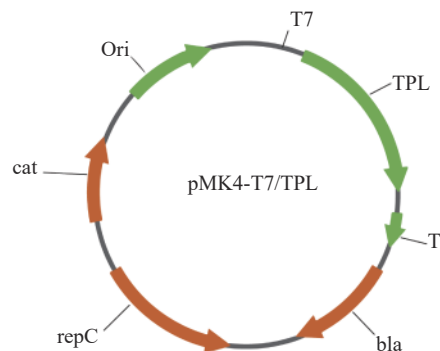


图 2 pMK4-T7/TPL 表达载体质粒图

Fig.2 pMK4-T7/TPL expression vector

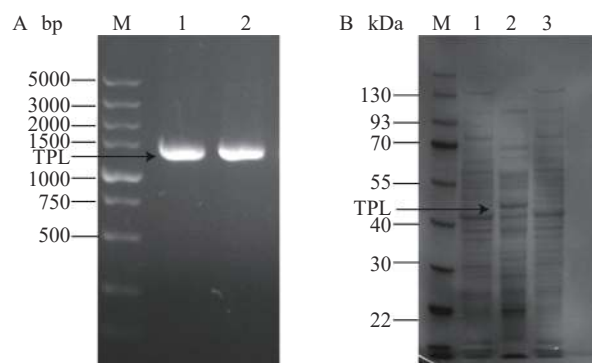


图 3 TPL 的克隆(A)与表达(B)结果

Fig.3 Results of TPL cloning and expression

注: A.泳道 M: DL 5000 marker; 泳道 1~2: TPL 克隆结果; B. 泳道 M: protein marker; 泳道 1: *B. subtilis*164T7P 粗酶液; 泳道 2: KC-TPL 粗酶液; 泳道 3: *B. subtilis*164T7P-pMK4-T7 粗酶液。

2.2 酪氨酸酚裂解酶在重组枯草芽孢杆菌中表达优化结果

2.2.1 培养温度对酪氨酸酚裂解酶的表达影响 培养温度对酶蛋白的转录翻译以及细菌的生长速率有较大影响。温度升高可加速蛋白质的扩散和碰撞速率, 但温度上升到某一值后, 酶蛋白逐渐变性, 同样, 温度过低也可能导致蛋白质的去折叠、聚集等问题。因此按照方法 1.2.4.1 加入诱导剂后, 分别在温度 20、25、30、35、40 ℃ 条件下诱导蛋白表达。比

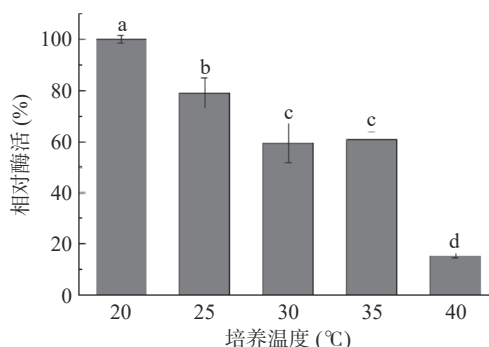


图 4 培养温度对重组枯草芽孢杆菌中 TPL 的表达影响

Fig.4 Influence of incubation temperature on the expression of TPL in recombinant *B. subtilis*

注: 不同字母表示组间有显著差异, $P < 0.05$; 图 5~图 6 同。

较 TPL 在不同温度诱导下的酶活,结果如图 4 所示。当培养温度为 20 ℃ 时(酶活定为 100%),TPL 酶活明显高于其他温度,酶活从 20 ℃ 到 40 ℃ 随着培养温度的升高而降低,因此 20 ℃ 为重组枯草芽孢杆菌最适培养温度。

2.2.2 培养时间对酪氨酸酚裂解酶的表达影响 培养时间影响菌体的生长状态,对于重组蛋白的积累效率起着直接的影响。如果培养时间过短,酶蛋白积累量将会减少。而如果诱导时间过长,菌体的生长状态会受到影响,并且菌体自溶和宿主内源性蛋白酶的产生都会降低目标蛋白的积累,从而对酶活产生影响^[26]。按照方法 1.2.4.1 加入诱导剂后,分别在 12、24、36、48、60 h 不同的诱导时间取一定量的菌体进行酶活测定,结果如图 5 所示。当培养时间低于 36 h 时,TPL 酶活逐渐增加,36 h 时达到最大值(酶活定义为 100%),随后超过 36 h 后 TPL 酶活开始降低,可能是诱导蛋白表达后期的代谢副产物积累影响酶蛋白表达,因此将诱导表达 36 h 的重组枯草芽孢杆菌用于后续全细胞实验。

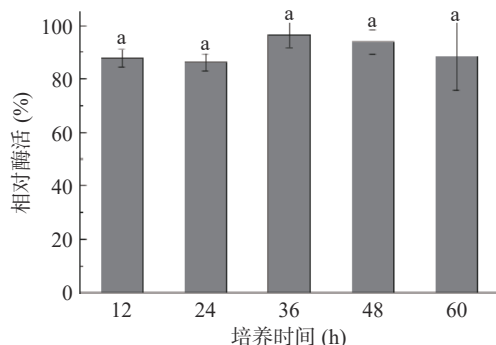


图 5 培养时间对重组枯草芽孢杆菌中 TPL 表达的影响
Fig.5 Influence of incubation time on the expression of TPL in recombinant *B. subtilis*

2.2.3 诱导剂浓度对酪氨酸酚裂解酶的表达影响 D-木糖作为诱导剂,一方面 D-木糖浓度过低会达不到与阻遏蛋白结合的饱和浓度,另一方面浓度过高会导致酶蛋白折叠不完全形成包涵体,并抑制菌体生长,为了防止包涵体的生成^[27]。按照方法 1.2.4.1 分

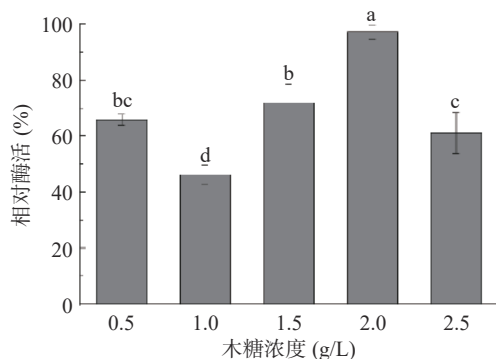


图 6 D-木糖浓度对重组枯草芽孢杆菌中 TPL 表达的影响
Fig.6 Influence of D-xylose concentration on the expression of TPL in recombinant *B. subtilis*

别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L 终浓度的 D-木糖诱导,测量重组枯草芽孢杆菌在不同浓度 D-木糖诱导条件下的酶活,结果如图 6 所示。随着 D-木糖浓度提高,TPL 酶活也随之增加,当 D-木糖浓度达到 2.0 g/L(酶活定义为 100%)时 TPL 的活性最高,此后随着 D-木糖浓度加大,TPL 的活性反而下降。

2.3 全细胞转化条件优化结果

2.3.1 苯酚毒性浓度对全细胞催化合成 L-酪氨酸的影响 一些文章报道指出,高浓度的苯酚会使蛋白质发生变质和沉淀,对细胞有直接损伤^[28-29],因此苯酚浓度是影响酶催化法生成 L-Tyr 的关键因素,为了研究苯酚浓度对全细胞转化体系的影响,按照方法 1.2.7,在反应体系中加入不同浓度的苯酚后检测 L-Tyr 的产量,结果如图 7 所示。苯酚浓度在 75 mmol/L 时的 L-Tyr 产量最高达到 6.5 g/L,当苯酚浓度高于 75 mmol/L 时,苯酚会对 L-Tyr 的合成产生明显抑制,苯酚浓度大于 125 mmol/L 时没有 L-Tyr 生成。

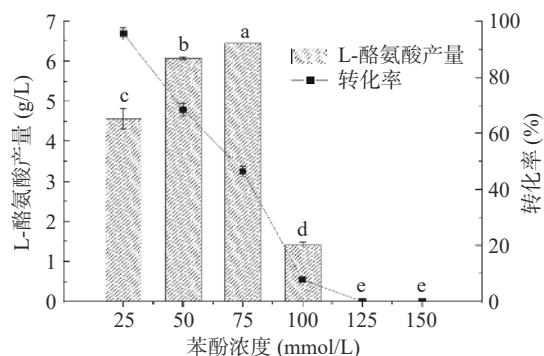


图 7 苯酚浓度对 KC-TPL 全细胞转化合成 L-酪氨酸的影响
Fig.7 Influence of phenol concentration on the synthesis of L-Tyr by whole-cell transformation of KC-TPL

注:不同字母表示组间 L-酪氨酸产量有显著差异, $P<0.05$;图 8~图 12 同。

2.3.2 细胞浓度对全细胞催化合成 L-酪氨酸的影响

为了满足实际工业生产的效率需求并降低生产成本,需要对全细胞反应体系中的细胞浓度进行优化。不同细胞浓度代表不同的酶添加量,细胞浓度对于全细胞酶促反应起着正向的促进作用,但转化效率不会和菌体量成正比。为了控制成本和高效经济性,按照

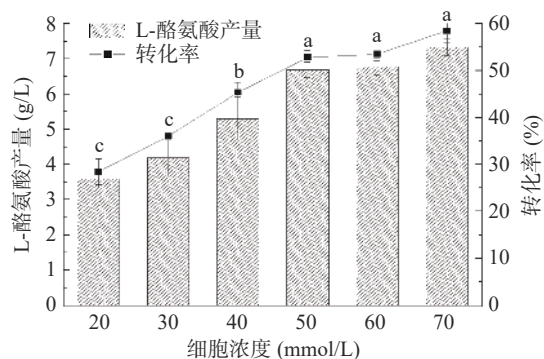


图 8 细胞浓度对 KC-TPL 全细胞转化合成 L-酪氨酸的影响
Fig.8 Influence of cell concentration on the synthesis of L-Tyr by whole-cell transformation of KC-TPL

方法 1.2.7, 控制苯酚浓度为 75 mmol/L, 在全细胞转化体系中加入不同浓度的湿细胞, 结果如图 8 所示。随着细胞浓度的提高 L-Tyr 产量也随之增加, 当细胞浓度达到 50 g/L 后, 进一步提高细胞浓度 L-Tyr 产量并没有明显提升, 考虑到成本因素, 全细胞转化细胞浓度确定为 50 g/L。

2.3.3 转化温度对全细胞合成 L-酪氨酸的影响 温度对于酶的状态和稳定性都有重要影响, 在一定范围内酶促反应速率随着温度的升高而增加, 当温度升高到一定程度后, 酶的结构会受到破坏而丧失活性, 温度同时也是工业应用中需要控制的重要成本之一。按照方法 1.2.7, 同时控制湿细胞浓度为 50 g/L、苯酚浓度为 75 mmol/L, 在不同温度环境下进行全细胞转化, 结果如图 9 所示。随着转化温度梯度的变化, L-Tyr 的产量呈现先升高再降低的趋势, 反应温度在 20~40 °C 时, L-Tyr 产量都能保持在较高水平, 当反应温度为 35 °C 时 L-Tyr 的产量最高, 约为 8.02 g/L。当温度大于 40 °C 时, L-Tyr 产量开始下降。最佳转化温度和 Kumagai 等^[30] 研究中的酶最适温度相比偏低, 可能是因为全细胞转化合成 L-Tyr 的时间较长, 温度过高会加速苯酚的氧化和 TPL 的活性丧失。

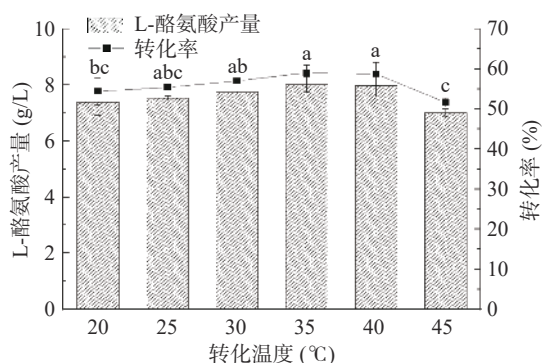


图 9 转化温度对 KC-TPL 全细胞转化合成 L-酪氨酸的影响
Fig.9 Influence of reaction temperature on the synthesis of L-Tyr by whole-cell transformation of KC-TPL

2.3.4 反应初始 pH 对全细胞合成 L-酪氨酸的影响 pH 可以改变酶活性部位有关基团的解离状态, 进

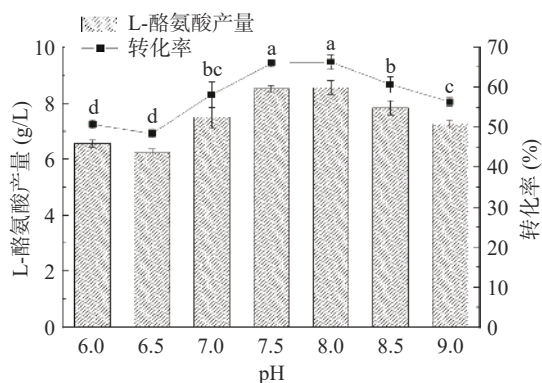


图 10 反应初始 pH 对 KC-TPL 全细胞转化合成 L-酪氨酸的影响

Fig.10 Influence of reaction pH on the synthesis of L-Tyr by whole-cell transformation of KC-TPL

而影响酶活性部位与底物的结合, 为了使全细胞转化反应更加高效, 按照方法 1.2.7, 同时控制细胞浓度为 50 g/L、苯酚浓度为 75 mmol/L、反应温度 35 °C, 对反应初始 pH 进行研究, 结果如图 10 所示。重组枯草芽孢杆菌在弱碱性条件下表现出很强的催化能力, 在转化 pH 为 6~7.5 时, L-Tyr 产量随着 pH 升高而增加, 当 pH=8.0 时 L-Tyr 的产量达到最高的 8.5 g/L, 之后当 pH>8.0 时 L-Tyr 产量逐渐减少。

2.3.5 PLP 浓度对全细胞合成 L-酪氨酸的影响 PLP 是一种重要的辅酶, 在酪氨酸酶酚裂解酶催化的反应中, PLP 起到“中间桥梁”的作用, 可以与 TPL 活性中心形成内醛亚胺结构, 维持底物 α 羧基的稳定^[18]。适宜浓度的 PLP 可以有效保证 TPL 酶活, 为了控制成本的同时保证酶活性, 按照方法 1.2.7, 控制细胞浓度为 50 g/L、底物浓度为 75 mmol/L、反应温度 35 °C、反应初始 pH 8.0, 在全细胞转化反应中加入不同浓度的 PLP 进行研究, 结果如图 11 所示。当 PLP 浓度达到 0.08 g/L 后, L-Tyr 基本维持在 9.38 g/L 左右, 因此考虑到成本因素, PLP 在全细胞转化反应中的添加浓度为 0.08 g/L。

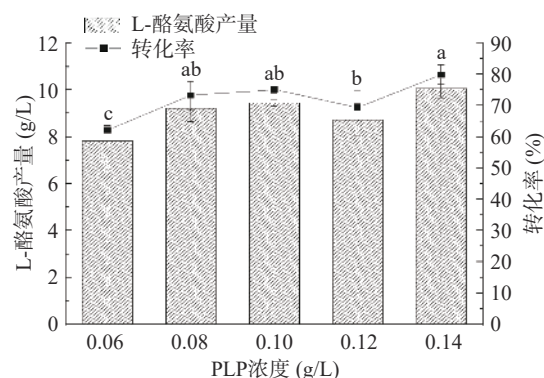


图 11 PLP 浓度对重组菌 KC-TPL 全细胞转化合成 L-酪氨酸的影响

Fig.11 Influence of PLP concentration on the synthesis of L-Tyr by whole-cell transformation of KC-TPL

2.3.6 苯酚分批补料合成 L-酪氨酸 分批补料是指将补充的物料分成若干份加入到反应体系中。当底物的浓度降低到一定水平时, 开始第一次补料, 补料以后该底物浓度会有所升高, 由于酶促反应的消耗, 该底物浓度将再次降低, 于是进行第二次补料, 以此类推, 直至全细胞转化结束^[31], 分批补料可以有效减少底物抑制的影响。在 TPL 催化的全细胞反应中, 苯酚对于 TPL 的抑制作用是影响全细胞转化反应的关键因素, 尤其是当初始苯酚浓度达到 125 mmol/L 时 L-酪氨酸的产量为零, 因此将苯酚维持在一个较低的浓度可以保持酶的催化能力。在其他条件都为最优情况下, 首次投料 25 mmol/L 苯酚和丙酮酸钠, 分 4 次补料, 每隔 4 h 补加 25 mmol/L, 共投料 125 mmol/L 底物。反应 20 h 后结果如图 12 所示, L-酪氨酸的产量达到 15.12 g/L, 转化率为 75.51%。

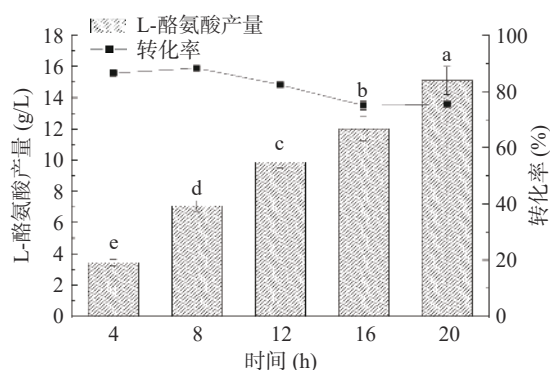


图 12 底物分批补料生产 L-酪氨酸

Fig.12 Substrate batch replenishment for L-Tyr production

3 结论

本次研究将 TPL 基因在枯草芽孢杆菌中克隆表达,成功构建重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 164T7P-pMK4-T7/TPL, 首先通过培养条件优化实现了 TPL 在重组枯草芽孢杆菌中的高效表达,接着对重组枯草芽孢杆菌全细胞转化条件优化,最终在 35 ℃、pH8、细胞浓度为 50 g/L、底物苯酚 75 mmol/L、丙酮酸钠 75 mmol/L、氯化铵 487 mmol/L、亚硫酸钠 2.0 g/L、EDTA 2.0 g/L 和 PLP 0.08 g/L 条件下全细胞转化得到 9.38 g/L L-Tyr, 转化率为 73.24%。为进一步为了解除高浓度底物苯酚对于 TPL 的抑制,通过分批补料策略,在 20 h 内分批补料 4 次,每次补料 25 mmol/L 苯酚,最终获得 15.12 g/L 的 L-Tyr, 转化率为 75.51%。不同于以往用大肠杆菌作为 L-Tyr 生产工程菌,本研究首次将 TPL 在枯草芽孢杆菌中异源表达,开发了一种食品安全级酶催化生产 L-Tyr 的方法,通过全细胞转化方式生产 L-Tyr, 保证 L-Tyr 安全性的同时,也避免了酶反应的复杂操作,简化了工艺流程。本次研究得到的 L-酪氨酸产量相对较低,后续需要对补料间隔时间和补料量做进一步研究,更好发挥重组工程菌的生产潜力。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 张乐, 陈润花, 门靖. 酪氨酸分析检测研究进展[J]. 精细化工中间体, 2022, 52(2): 1-4. [ZHANG Le, CHEN Runhua, MEN Jing. Research progress in the analysis and detection of tyrosine[J]. Fine Chemical Intermediates, 2022, 52(2): 1-4.]
- [2] SCHENCK C A, MAEDA H A. Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants[J]. *Phytochemistry*, 2018, 149: 82-102.
- [3] LEHRER S, RHEINSTEIN P H. α -Synuclein enfold tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase, potentially reducing dopamine and norepinephrine synthesis[J]. *Journal of Proteins and Proteomics*, 2022, 13(2): 109-115.
- [4] LEHNERT H, REINSTEIN D K, STROWBRIDGE B W, et al. Neurochemical and behavioral consequences of acute, uncontrol-

lable stress: Effects of dietary tyrosine[J]. *Brain Research*, 1984, 303: 215-223.

[5] 吴梦迪. 铁卟啉催化活性及其应用研究[D]. 西安: 西北大学, 2018. [WU Mengdi. A study on the catalytic activity of iron porphyrin and its application[D]. Xi'an: Northwest University, 2018.]

[6] RUAN X, ZHANG S, SONG W, et al. Efficient synthesis of tyrosol from L-tyrosine via heterologous Ehrlich pathway in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2022, 47: 18-30.

[7] ALI S, SHULTZ J L, IKRAM UL H. High performance microbiological transformation of L-tyrosine to L-dopa by *Yarrowia lipolytica* NRRL-143[J]. *BMC Biotechnology*, 2007, 7(1): 50.

[8] LI Y, MAO J, SONG X, et al. Optimization of the L-tyrosine metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by analyzing p-coumaric acid production[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(6): 258.

[9] GUO X, WU X, MA H, et al. Yeast: A platform for the production of L-tyrosine derivatives[J]. *Yeast*, 2023, 40(5-6): 214-230.

[10] 姚元锋. L-酪氨酸代谢平台构建及其在丹参素合成中的应用[D]. 天津: 天津大学, 2013. [YAO Yuanfeng. Constructing the L-Tyrosine metabolic platform and its application on the production of Danshensu[D]. Tianjin: Tianjin University, 2013.]

[11] 李秀华, 王自璠, 王后方. L-酪氨酸的合成研究[J]. 科技信息, 2007(33): 23-24. [LI Xiuhua, WANG Ziyang, WANG Houfang. Study on the synthesis of L-Tyrosine[J]. *Science & Technology Information*, 2007(33): 23-24.]

[12] 吴敏. 化学-酶法合成 L-酪氨酸[D]. 南京: 南京工业大学, 1999. [WU Min. Studies on synthesis of L-Tyrosine by chemico-enzymatic pathway[D]. Nanjing: Nanjing Tech University, 1999.]

[13] PING J, WANG L, QIN Z, et al. Synergetic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-tyrosine[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(4): 724-731.

[14] KURPEJOVIĆ E, BURGARDT A, BASTEM G M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-tyrosine production from glucose and xylose[J]. *Journal of Biotechnology*, 2023, 363: 8-16.

[15] SEISSER B, ZINKL R, GRUBER K, et al. Cutting long syntheses short: Access to non-natural tyrosine derivatives employing an engineered tyrosine phenol lyase[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2010, 352(4): 731-736.

[16] 常俊俊, 刘均忠, 刘茜, 等. 重组酪氨酸酚裂解酶全细胞催化合成 L-酪氨酸[J]. 精细化工, 2013, 30(10): 1112-1116, 1137.

[CHANG Junjun, LIU Junhong, LIU Xi, et al. Synthesis of L-Tyrosine by whole cell with recombinant tyrosine phenol lyase[J]. *Fine Chemicals*, 2013, 30(10): 1112-1116, 1137.]

[17] XU S, ZHANG Y, LI Y, et al. Production of L-tyrosine using tyrosine phenol-lyase by whole cell biotransformation approach[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 131: 109430.

[18] LI G, LIAN J, XUE H, et al. Biocascade synthesis of L-Tyrosine derivatives by coupling a thermophilic tyrosine phenol-lyase and L-lactate oxidase[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2020, 2020(8): 1050-1054.

[19] TANJI Y, HATTORI K, SUZUKI K, et al. Spontaneous deletion of a 209-kilobase-pair fragment from the *Escherichia coli* genome occurs with acquisition of resistance to an assortment of infectious phages[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(14): 4256-4263.

[20] EJAZ S, KHAN H, SARWAR N, et al. A review on recent advancement in expression strategies used in *Bacillus subtilis*[J]. *Protein & Peptide Letters*, 2022, 29(9): 733-743.

- [21] JI M, LI S, CHEN A, et al. A wheat bran inducible expression system for the efficient production of α -L-arabinofuranosidase in *Bacillus subtilis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 144: 109726.
- [22] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 87–92. [JOSEPH S. Molecular cloning[M]. Beijing: Science Press, 2002: 87–92.]
- [23] 梁栋, 陈芳, 张良, 等. 枯草芽孢杆菌中胞壁肽的分离纯化及其对芽孢的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 369–374. [LIANG Dong, CHEN Fang, ZHANG Liang, et al. The isolation and purification of muropeptides from the *Bacillus subtilis* and its effect on spore germination[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 369–374.]
- [24] 陈明亮, 张利坤, 杨卫华, 等. 三酶偶联全细胞生物合成 L-酪氨酸[J]. 精细化工, 2019, 36(3): 455–460. [CHEN Mingliang, ZHANG Likun, YANG Weihua, et al. Biosynthesis of L-tyrosine with aldolase, d-serine dehydratase and tyrosine phenol-lyase[J]. Fine Chemicals, 2019, 36(3): 455–460.]
- [25] HEBERLING M M, MASMAN M F, BARTSCH S, et al. Ironing out their differences: Dissecting the structural determinants of a phenylalanine aminomutase and ammonia lyase[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(4): 989–997.
- [26] 解静聪, 蒋剑春, 高月淑, 等. 重组木聚糖酶的诱导表达及其定向制备低聚木糖的研究[J]. 林产化学与工业, 2020, 40(5): 99–106. [XIE Jingcong, JIANG Jianchun, GAO Yueshu, et al. Induced expression of recombinant β -1,4-xylanase and its directional preparation of xylo-oligosaccharide[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2020, 40(5): 99–106.]
- [27] SOEJIMA K, MIMURA N, YONEMURA H, et al. An efficient refolding method for the preparation of recombinant human prethrombin-2 and characterization of the recombinant-derived thrombin[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2001, 130(2): 269–277.
- [28] KIM D Y, RHA E, CHOI S L, et al. Development of bioreactor system for L-tyrosine synthesis using thermostable tyrosine phenol-lyase[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(1): 116–122.
- [29] XU S, WANG Q, ZENG W, et al. Construction of a heat-inducible *Escherichia coli* strain for efficient de novo biosynthesis of L-tyrosine[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 92: 85–92.
- [30] KUMAGAI H, KASHIMA N, TORII H, et al. Purification, crystallization and properties of tyrosine phenol lyase from *Erwinia herbicola*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1972, 36(3): 472–482.
- [31] MEARS L, STOCKS S M, SIN G, et al. A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 245: 34–46.