

酶法高效转化苯乙酮酸合成L-苯甘氨酸*

刘巧利 杨套伟 周俊平 徐美娟 张显 饶志明**

江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122

摘要 L-苯甘氨酸是合成多种抗生素和抗癌药物的重要中间体, 目前主要通过化学法合成. 利用蜡样芽孢杆菌来源的亮氨酸脱氢酶 (LeuDH) 催化苯乙酮酸的还原氨基化合成L-苯甘氨酸, 并偶联甲酸脱氢酶 (FDH) 进行辅酶再生, 建立了一种新型的苯甘氨酸生物合成方法. 结果表明, 该辅酶再生体系可有效地用于L-苯甘氨酸的合成, 且没有副产物残留, 辅底物甲酸铵还可提供还原氨基化所需 NH_4^+ , 随后对酶转化条件进行优化, 最适转化条件为苯乙酮酸60 g/L, 甲酸铵50.4 g/L, LeuDH 4 U/mL, FDH 2 U/mL, NAD^+ 浓度0.14 g/L, pH 8.0以及30 °C. 在最优条件下, 1 L的转化体系中, 转化反应5 h, 苯乙酮酸转化率达到99%, L-苯甘氨酸产量60.2 g/L, ee值>99%. 本研究为L-苯甘氨酸的工业生产提供了一种更加简单、高效、经济的生物合成途径. (图8表4参27)

关键词 L-苯甘氨酸; 苯乙酮酸; 亮氨酸脱氢酶; 甲酸脱氢酶; 辅酶再生体系

CLC Q814.9

Efficient enzymatic synthesis of L-phenylglycine from benzoylformic acid*

LIU Qiaoli, YANG Taowei, ZHOU Junping, XU Meijuan, ZHANG Xian & RAO Zhiming**

Ministry of Education Key Laboratory of Industrial Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract L-phenylglycine, an important intermediate in the synthesis of various antibiotics and anticancer drugs, is currently mainly synthesized through chemical methods. In this study, a new biological synthesis method for L-phenylglycine was developed. Leucine dehydrogenase (LeuDH) from *Bacillus cereus* was used to catalyze the reductive amination of benzoylformic acid for L-phenylglycine synthesis, and formate dehydrogenase (FDH) was used for cofactor regeneration. The results showed that the cofactor regeneration system was effective for the synthesis of L-phenylglycine without any by-products, and the reaction cosubstrate ammonium formate further provided the ammonium ions (NH_4^+) required for reductive amination. The enzymatic transformation conditions were then optimized to improve conversion efficiency. The obtained optimal conversion conditions were: benzoylformic acid 60 g/L, ammonium formate 50.4 g/L, LeuDH 4 U/mL, FDH 2 U/mL, NAD^+ concentration 0.14 g/L, pH 8.0, and a temperature of 30 °C. Finally, under these optimal conditions, a 99% conversion rate was achieved in 5 h with the yield of 60.2 g/L, and an ee value > 99% at 1 L scale. This study, therefore, provides a simplified, more efficient and economical biosynthetic method for L-phenylglycine production.

Keywords L-phenylglycine; benzoylformic acid; leucine dehydrogenase; formate dehydrogenase; cofactor regeneration system

L-苯甘氨酸是一种手性非天然芳香族 α -氨基酸, 作为一种重要的原料化合物和药物中间体, 可用于合成青霉素^[1]、维及霉素^[2]、普那霉素^[3-4]等 β -内酰胺类抗生素, 也可用于

抗肿瘤药物紫衫醇的合成^[5]. L-苯甘氨酸的制备方法可分为化学和生物合成法两类. 化学合成法反应条件剧烈, 工艺复杂, 副产物较多, 得到的产品大多光学纯度不够, 需要进一步光学拆分, 且合成过程中需要用到大量的有机溶剂和有毒物质, 工业污染严重^[6-7]. 生物合成法中微生物发酵法体系成分复杂, 不利于产品的分离, 产量较低, 难以实现工业化^[8], 酶催化法具有立体选择性更强、副产物少、体系更简单、产品易于分离等特点, 在制备光学纯度的L-苯甘氨酸中具有广阔的应用前景.

目前国内外生物催化法合成L-苯甘氨酸主要是通过氨基酸脱氢酶的还原氨基化反应, 例如, Kroutil等构建了一个由扁桃酸消旋酶、扁桃酸脱氢酶和氨基酸脱氢酶组成的多酶级联反应, 可以将外消旋扁桃酸转化成光学纯的L-苯甘氨酸^[9]. 徐建和等利用扁桃酸消旋酶, 新型的扁桃酸脱氢酶

收稿日期 Received: 2018-07-07 接受日期 Accepted: 2018-07-26

*江苏省杰出青年科学基金项目 (BK20150002)、国家自然科学基金项目 (21778024)、中国博士后科学基金 (2017M620189)、国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助项目 (LITE2018-06)、中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP51708A) 和江苏高校优势学科建设工程项目资助. Supported by the Jiangsu Province Science Foundation for Distinguished Young Scholars (BK20150002), the National Natural Science Foundation of China (21778024), the China Postdoctoral Science Foundation (2017M620189), the National Light Industry Technology and Engineering First-class Discipline Independent Fund (LITE2018-06), the Special Funds for Basic Scientific Research Business Expenses of National Colleges of China (JUSRP51708A) and the Jiangsu Province Colleges Advantage Discipline Construction Fund

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn)

和新型的亮氨酸脱氢酶构建了同样的级联反应, 经过12 h的转化反应, 30.4 g/L外消旋扁桃酸转化率达到96.4%, ee值>99%, 但是进一步提高底物浓度转化率就会明显下降, 很难实现大规模工业化生产^[10]。另外, 倪晔等在大肠杆菌中构建了新型的氨基酸脱氢酶和葡萄糖脱氢酶的共表达的体系, 利用全细胞作为催化剂, 60 g/L的苯乙酮酸转化率达到99%, ee值>99%^[11], 该体系L-苯甘氨酸的产量进一步提高, 但需要葡萄糖和氯化铵两种辅底物, 反应体系复杂, 副产物葡萄糖酸会造成转化体系不稳定, 且难以与产物分离, 增加生产成本。

亮氨酸脱氢酶 (LeuDH, EC 1.4.1.9) 是一种NADH依赖型的氧化还原酶, 可以催化多种酮酸的还原氨基化生成相应的L-氨基酸^[12], 例如L-叔亮氨酸^[13]、L-氨基丁酸^[14]及L-正缬氨酸^[15]等。本实验室前期对来源于蜡样芽孢杆菌的LeuDH的酶学特性研究发现, 该酶对于苯乙酮酸的 K_m 和 k_{cat} 值分别为9.38 mmol/L和0.18/S^[16], 说明LeuDH对苯乙酮酸有良好的亲和性和催化特性, 因此本研究首次将该LeuDH用于催化苯乙酮酸合成L-苯甘氨酸。由于还原型辅酶NADH价格昂贵, 难以应用于工业添加, 一般可通过酶偶联法实现辅酶的再生。葡萄糖脱氢酶 (GDH, EC 1.1.1.118) 和甲酸脱氢酶 (FDH, EC 1.2.1.2) 是构建辅酶再生体系最常用的酶, 其中由LeuDH和FDH构成的辅酶循环体系已经应用于L-叔亮氨酸的工业生产^[17-18]。本研究通过对辅酶再生酶的筛选, 将由LeuDH和FDH构成的辅酶循环体系应用于L-苯甘氨酸的酶法合成中, 如图1所示, 即LeuDH催化苯乙酮酸的还原氨基化, FDH氧化甲酸铵为CO₂和水, 同时还原NAD⁺实现NADH再生, 甲酸铵还可以提供还原氨基化反应所需NH₄⁺, 旨在为L-苯甘氨酸工业生产建立一种更加简单、高效、经济、清洁的生物合成方法。

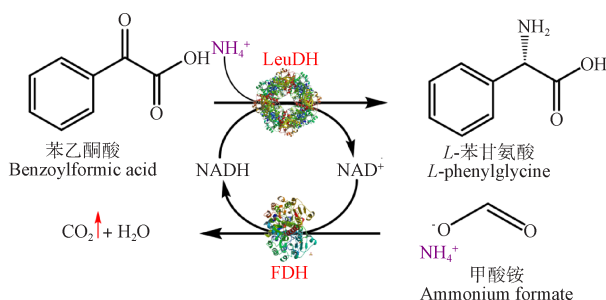


图1 酶法催化合成L-苯甘氨酸。

Fig. 1 Biosynthesis of L-phenylglycine by enzymes.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用的菌株和质粒如表1所示。

1.2 主要试剂与仪器

DL-苯甘氨酸标准品 (纯度>98.5%, D型和L型的比例为1:1), 苯乙酮酸标准品 (纯度>98.5%) 均购自Sigma公司。分子生物学工具酶、DNA markers均购自TaKaRa公司。基因组提取试剂盒、DNA回收试剂及质粒提取试剂盒均购自上海捷瑞生物工程有限公司。引物合成与核酸序列测定由上海金唯智生物工程公司完成; 其他试剂均购自国药集团。PCR

仪购自 Bio-Rad 公司; UVP凝胶成像仪购自英国UVP有限公司; 高速冷冻离心机购自HITACHI公司; 超声破碎仪购自SONICS公司; 高效液相色谱仪购自Agilent 公司。色谱柱: C18、C8及有机酸柱均购自DIMARK公司。

表1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

菌株或质粒 Strain or plasmid	特征 Characteristics	来源 Ref or note
菌株 Strain		
<i>Escherichia coli</i> BL21	<i>F-dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal λ(DE3)</i>	实验室储存 Lab stock
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-mK-)supE44</i>	实验室储存 Lab stock
质粒 Plasmid		
pET28a	Km ^R ,	实验室储存 Lab stock
pET28a- <i>ldh</i>	Km ^R , expression LeuDH in <i>E. coli</i>	本研究构建 This work
pET28a- <i>gdh</i>	Km ^R , expression GDH in <i>E. coli</i>	本研究构建 This work
pET28a- <i>fdh</i>	Km ^R , expression FDH in <i>E. coli</i>	本研究构建 This work

Km^R: 卡那霉素抗性。 Km^R: Kanamycin-resistant.

1.3 重组质粒的构建

根据NCBI中公布的蜡样芽孢杆菌*Bacillus cereus*来源的LeuDH基因*ldh* (GenBank登录号: 1206507)、枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*来源的GDH基因*gdh* (GenBank登录号: 938261) 以及博伊丁假丝酵母*Candida boidinii* 的FDH基因*fdh* (GenBank登录号: 7657866) 序列设计引物 (表2), 分别以*B. cereus*、*B. subtilis*和*C. boidinii* 基因组为模板, 进行PCR扩增, PCR产物*ldh*、*gdh*和*fdh*经过试剂盒纯化后, 分别连接至克隆载体pMD18-T, 转化*Escherichia coli* JM109, 通过氨苄青霉素 (AMP) 平板筛选阳性转化子, 提质粒酶切验证, 并进行测序鉴定。重组质粒pMD18-T-*ldh*、pMD18-T-*gdh*、pMD18-T-*fdh*和表达载体pET28a分别进行双酶切, 纯化回收后16 °C过夜连接, 热击转化表达载体*E. coli* BL21, 卡那霉素 (Kan) 平板筛选阳性转化子, 提质粒酶切验证, 测序鉴定, 证明重组质粒构建成功。

表2 本研究所用PCR扩增引物

Table 2 Primers for PCR amplification used in this study

引物名 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	酶切位点 Restriction site
L1	CGGGATCCATGACATTAGAAATCTTCG	<u>Bam</u> H I
L2	ACGCGTCTGACTTAGCGACGGCTAATAATATC	<u>Sal</u> I
G1	CGGGATCCATGTATCCGGATTTAAAAGG	<u>Bam</u> H I
G2	CCCAAGCTTTTAAACCGCGCCTGCCTGG	<u>Hind</u> III
F1	CGGGATCCATGAAGATCGTTTATAGTC	<u>Bam</u> H I
F2	ACGCGTCTGACTTATTCTTATCGTGTTTAC	<u>Sal</u> I

酶切位点用下划线标注。

The restriction enzyme sites are underlined.

1.4 重组菌的培养及诱导

LB种子培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0。

TB发酵培养基: 蛋白胨 12 g/L, 酵母粉 24 g/L, 甘油5 g/L

L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L.

重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*ldh*、*E. coli* BL21/pET28a-*gdh* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*fdh* 按照1%的接种量转接入10 mL种子培养基, 含Kan 50 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min下培养10 h. 种子液再按照1%的接种量接入发酵培养基, 37 $^\circ\text{C}$ 下培养, 至菌体 OD_{600} 值为0.3-0.5, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为0.5 mmol/L, 24 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min诱导12 h.

1.5 酶活性测定

4 $^\circ\text{C}$ 下离心发酵菌液 (8 000 r/min, 5 min), 并用0.1 mol/L的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤细胞两次后, 按照10倍浓缩的比例用缓冲液重新悬浮菌体, 低温下对菌体进行超声破碎 (破1 s停3 s, 15 min), 12 000 r/min离心20 min, 得到破碎粗酶液上清, 用于SDS-PAGE分析及酶活测定. LeuDH、FDH和GDH酶活性测定分别参考Ansorge^[19]、Zheng^[20]和Fujita^[21]等的报道.

1.6 L-苯甘氨酸的合成及条件优化

将底物苯乙酮酸溶于0.1 mol/L pH 7.5的磷酸缓冲液, 滴加50%的 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 使其溶解, 同时加入辅底物甲酸铵及5% (V/V) 的甘油, 最后加入LeuDH和GDH/FDH的粗酶液, 转化体系为20 mL, 置于磁力搅拌器上, 控制转速为160 r/min, 进行转化反应, 反应过程中通过滴加50%的 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 或20%的甲酸来调节反应体系的pH.

转化条件的优化: 在不同的 pH (6.0-9.0)、温度 (25-50 $^\circ\text{C}$)、底物浓度 (15-75 g/L)、 NAD^+ 浓度 (0-0.35 g/L)、辅底物与底物比例 (0.5:1-4:1)、LeuDH与FDH比例 (0.5:1-5:1) 以及酶的添加量的条件下进行L-苯甘氨酸的转化实验, 通过HPLC检测不同转化条件下在转化开始30 min时的L-苯甘氨酸的产量, 计算该条件下的初始反应速率 (反应初始30 min L-苯甘氨酸产量与时间的线性关系如图2所示). HPLC法检测产物L-苯甘氨酸的产量及ee值的具体方法参考Cheng等人的检测方法^[11].

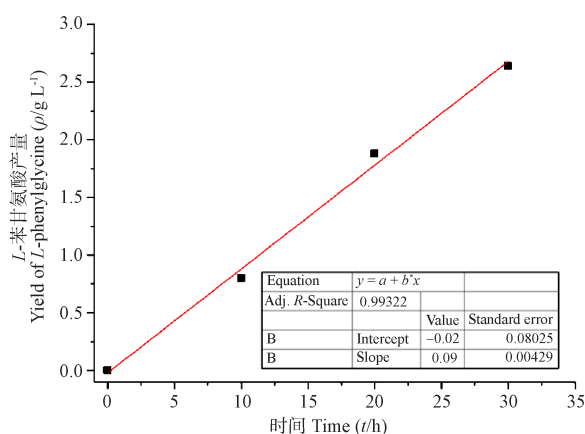


图2 L-苯甘氨酸合成初始反应速率曲线.

Fig. 2 Determination of initial rate in the synthesis of L-phenylglycine.

2 结果与讨论

2.1 LeuDH、GDH及FDH基因的表达及酶活

以 *B. cereus*、*B. subtilis* 和 *C. boidinii* 基因组为模板, 进行

PCR扩增, PCR产物分别为1 101 bp、786 bp和1 095 bp (图3), 经测序鉴定与NCBI数据库中该来源的LeuDH、GDH及FDH基因序列一致, 通过限制性酶切分别将目的基因插入表达载体pET28a, 并转化至表达宿主 *E. coli* BL21, 将经过诱导表达的重组菌 *E. coli*/pET28a-*ldh*、*E. coli*/pET28a-*gdh*、*E. coli*/pET28a-*fdh* 及原始菌株分别超声破碎并离心后, 取上清进行SDS-PAGE分析及酶活测定. 如图4所示, LeuDH、GDH及FDH的蛋白条带相对分子质量 (M_r) 分别为 40.4×10^3 、 28.9×10^3 和 40.2×10^3 , 与基因序列一致. 分别测各重组菌粗酶液的酶活, 以原始菌表达空载pET28a作为对照, 结果如表3所示, 重组菌LeuDH酶活为27.6 U/mL, 是对照组的400多倍; 重组菌FDH和GDH酶活分别为0.55 U/mL和22.4 U/mL, 对照组未检测到FDH和GDH酶活, 说明LeuDH、GDH及FDH可在大肠杆菌中可溶表达.

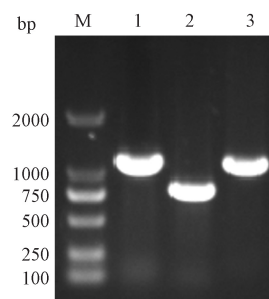


图3 LeuDH、GDH及FDH的基因PCR.

Fig. 3 PCR of the genes of LeuDH, GDH and FDH. M: DNA marker; 1: *ldh*; 2: *gdh*; 3: *fdh*.

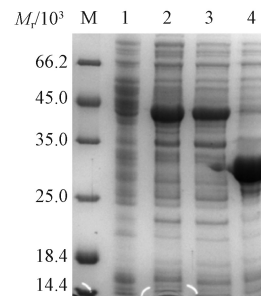


图4 LeuDH、GDH及FDH的SDS-PAGE分析.

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of LeuDH, GDH and and FDH. M: Protein marker; 1: *E. coli*/pET28a; 2: *E. coli*/pET28a-*ldh*; 3: *E. coli*/pET28a-*fdh*; 4: *E. coli*/pET28a-*gdh*.

2.2 辅酶再生体系的构建及筛选

为了建立一种更加经济、高效的合成L-苯甘氨酸的方法, 我们首先对来源于蜡样芽孢杆菌的LeuDH对于苯乙酮酸的转化能力进行验证, 同时对常用的提供辅酶再生的两种酶GDH和FDH进行筛选. 在苯乙酮酸7.5 g/L、甲酸铵3.15 g/L及 NAD^+ 0.07 g/L的20 mL的转化体系中分别加入LeuDH和GDH, 以及LeuDH和FDH的粗酶液, 并以LeuDH和原始菌株粗酶液组作为对照, 各粗酶液在转化体系中的终浓度均为1 U/mL, 转化反应于pH 7.5, 160 r/min、30 $^\circ\text{C}$ 条件下进行. 结果如图5所示, 在对照组LeuDH单酶转化体系中, L-苯甘氨酸的产量仅为0.38 g/L, 而LeuDH分别与GDH和FDH偶联的辅酶再生体系中, 7.5 g/L的苯乙酮酸在2 h内转化率均>99%, 且

两者转化速率相当, 产物的ee值均>99%, 说明蜡样芽孢杆菌来源的LeuDH可以有效地应用于光学纯度的L-苯甘氨酸的合成, 同时也证明, 当GDH和FDH在体系中酶活相同时, 它们提供NADH的再生效率也相当. 虽然GDH的比酶活较高, 但是当利用GDH进行辅酶再生时, 除了需要添加葡萄糖作为辅底物之外, 还需要额外添加铵盐为还原氨基化反应提供 NH_4^+ , 同时副产物葡萄糖酸难以从转化体系中除去, 而当用FDH进行辅酶再生, 只需添加甲酸铵为辅底物, 副产物 CO_2 很容易除去, 且FDH催化的甲酸氧化反应不可逆, 综合考虑反应的有效性及经济性, 选择由LeuDH和FDH构成的辅酶再生体系用于L-苯甘氨酸的催化合成.

表3 LeuDH、FDH及GDH在大肠杆菌中的酶活

Table 3 The activities of LeuDH, FDH and GDH in *E. coli*

菌株 Strain	酶 Enzyme	酶活 Enzyme activity (A/U mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> BL21/pET28a	LeuDH	0.06 ± 0.01
<i>E. coli</i> BL21/pET28a-ldh	LeuDH	27.6 ± 0.24
<i>E. coli</i> BL21/pET28a	FDH	—
<i>E. coli</i> BL21/pET28a-fdh	FDH	0.55 ± 0.04
<i>E. coli</i> BL21/pET28a	GDH	—
<i>E. coli</i> BL21/pET28a-gdh	GDH	22.4 ± 0.35

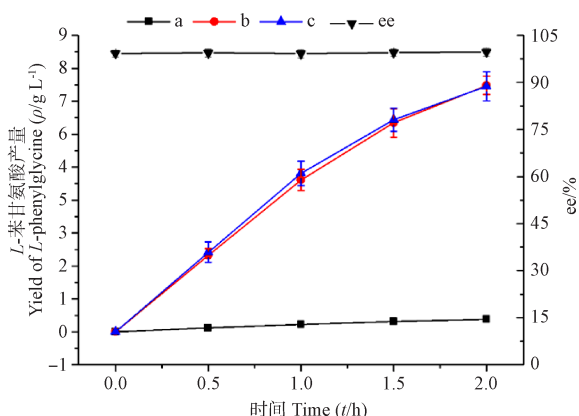
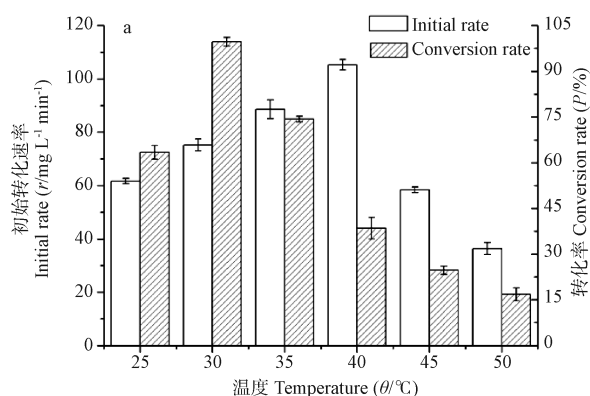


图5 不同辅酶再生体系合成L-苯甘氨酸.

Fig. 5 Synthesis of L-phenylglycine by different cofactor regeneration systems.

a: *E. coli*/pET28a-ldh and *E. coli*/pET28a; b: *E. coli*/pET28a-ldh and *E. coli*/pET28a-fdh; c: *E. coli*/pET28a-ldh and *E. coli*/pET28a-gdh.



2.3 酶法合成L-苯甘氨酸的条件优化

为了进一步提高由LeuDH和FDH构成的双酶催化体系合成L-苯甘氨酸的效率和产量, 本研究对转化条件进行系统优化. 如1.6所述, 所有反应均在160 r/min、20 mL体系中进行.

2.3.1 温度及pH对转化的影响 在多酶催化的反应中, 每个酶都有各自不同的最适反应温度及pH, 例如LeuDH和FDH的最适反应温度分别为55 °C和37 °C, 而LeuDH的最适反应pH为8.5, FDH的最适反应pH为7.5-8.5^[22-23], 因此, 在两酶偶联的反应中, 为了能够达到最佳的转化效果, 需要对转化的最佳温度和pH进行优化. 温度和pH不仅影响酶的反应速率, 同时也是影响酶的稳定性的关键因素, 因此考察温度和pH对转化的影响时, 不仅检测初始反应速率的变化, 同时检测5 h的转化率的变化. 底物浓度为15 g/L、甲酸铵6.3 g/L、NAD⁺ 0.07 g/L及pH 7.5的条件下, 考察了温度对转化反应的影响, 结果如图6a所示, 在温度为25-50 °C时, 随着温度的升高, 初始转化速率及转化率均出现先升后降的趋势, 初始反应速率在40 °C时达到最大值105.4 mg L⁻¹ min⁻¹, 而40 °C时的转化率仅为38.5%, 而30 °C时转化率为99.3%, 说明虽然酶在40 °C时的反应速率最大, 但是酶在30 °C以后稳定性就会变差, 不利于反应的持续进行, 因此合成L-苯甘氨酸的最适温度为30 °C. 同时考察了pH对转化的影响, 结果如图6b所示, 在pH为6.0-9.0时, 当pH ≤ 8, 初始转化速率和转化率随着pH的增加而升高, 但是当pH继续升高, 初始转化速率和转化率则会急剧下降, 说明过低或过高的pH均不利于反应的进行, 因此合成L-苯甘氨酸的最适pH为8.0.

2.3.2 两酶比例及辅底物与底物比例对转化的影响 根据文献报道, 在多酶催化的反应中, 只有在各个酶的反应相互协调时才能达到最佳的反应效果^[24-25], 因此本研究对该两酶偶联反应中两酶的比例进行了优化. 在反应体系中保持FDH的酶活为1 U/mL, LeuDH逐渐增加, 使得LeuDH:FDH从0.5:1增加到5:1, 结果如图7a所示, 随着LeuDH的逐步增加, 初始反应速率逐渐增加, 当LeuDH与FDH达到2:1时, 初始反应速率达到最大值120.5 mg L⁻¹ min⁻¹, 比两酶比例1:1时提高了41%, 但是继续增加LeuDH的量, 转化速率则逐步下降, 说明在该两酶催化的反应中, LeuDH与FDH的最佳比例为2:1, 与Qi等的报道^[26]类似.

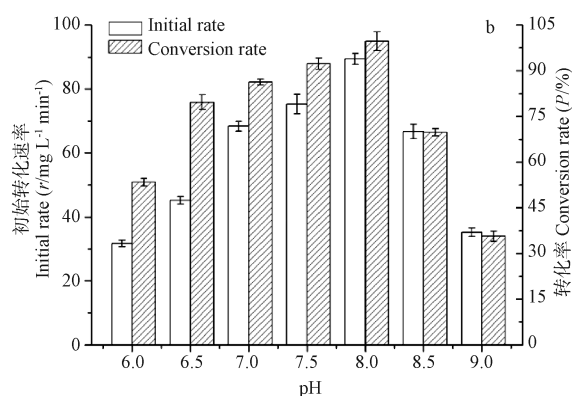


图6 温度(a)及pH(b)对转化的影响.

Fig. 6 The effect of temperature and pH on conversion.

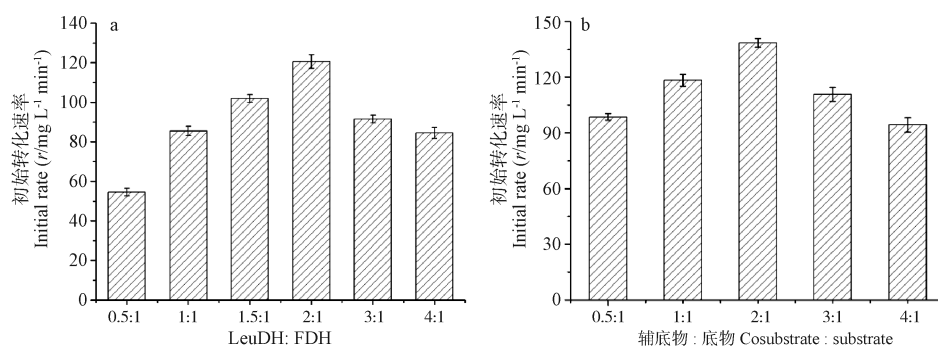


图7 两酶比例 (a) 及辅底物与底物比例 (b) 对转化的影响。

Fig. 7 The effect of the ratio of LeuDH : FDH and cosubstrate : substrate on conversion.

另外,在辅酶再生体系中,辅底物的浓度是影响辅酶再生效率的关键因素之一^[27],而且在该反应体系中,甲酸铵同时也是还原氨基化反应的氨基供体,因此本研究对甲酸铵的浓度进行优化。在反应体系中,保持苯乙酮浓度为15 g/L,通过调节甲酸铵的浓度使得甲酸铵与苯乙酮酸的物质的量比例从0.5:1增加到4:1,结果如图7b所示,随着甲酸铵的浓度的增加,初始反应速率先升后降,当甲酸铵与苯乙酮酸为2:1时,达到最大值138.5 $\text{mg L}^{-1} \text{min}^{-1}$,但是当甲酸铵的浓度继续增加反应速率则开始下降,因此在该反应体系中,甲酸铵与苯乙酮酸的最佳物质的量比例为2:1。

2.3.3 底物浓度、酶添加量以及 NAD^+ 浓度对转化的影响 在酶的催化反应中,底物浓度、酶的量以及辅酶浓度是影响转化率的3个关键因素,但是这3个因素又相互关联,因此为了达到最佳的转化效果,需综合考虑三者对产量和转化率的影响。在前期优化的最佳转化条件下(pH 8.0, 30 °C, LeuDH与FDH 2:1及甲酸铵与苯乙酮酸2:1)合成L-苯甘氨酸,并综合考察苯乙酮酸的浓度、LeuDH的添加量以及 NAD^+ 浓度对最终产量和转化率的影响,结果如表4所示,当反应体系中LeuDH为2 U/mL, NAD^+ 浓度为0.07 g/L时,15 g/L的底物可在2 h之内完全转化,但是当底物浓度增加到60 g/L时,转化持续12 h,转化率也只有74.3%,说明此时体系中酶的量不足。将LeuDH的添加量增加至4 U/mL, NAD^+ 浓度保持不变,转化持续12 h后,转化率为86.5%,说明单独提高酶的量并不能有效地提高转化率,因此进一步将 NAD^+ 浓度提高至0.14 g/L,此时转化持续5 h后,底物即完全转化,证明只有同时保证转化体系中酶和辅酶的充足供应才能有效地提高转化效率。然而当底物浓度继续提高至75 g/L时,即使进一步增加体系中

表4 底物、 NAD^+ 浓度及酶活对转化的影响Table 4 The effect of substrate, NAD^+ concentration and enzyme activities on conversion

底物 Substrate ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	LeuDH (U mL^{-1})	NAD^+ ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	时间 Time (t/h)	转化率 Conversion (P/%)
15	2	0.07	2	> 99
30	2	0.07	5	> 99
45	2	0.07	10	> 99
60	2	0.07	12	74.3
60	4	0.07	12	86.5
60	4	0.14	5	> 99
75	4	0.14	12	80.4
75	6	0.21	12	85.6

酶和 NAD^+ 的量,转化持续12 h后,转化率也只有85.6%,由于L-苯甘氨酸的水溶性很差,此时体系中有大量结晶存在,转化液非常黏稠,因此转化率无法进一步提高可能是因为大量的结晶急剧增加了转化体系的传质阻力,同时影响酶的催化特性。最终单批转化经优化后,60 g/L的底物在5 h内可以实现完全转化。

2.4 1 L反应体系中酶法转化合成L-苯甘氨酸

在20 mL转化体系中对LeuDH和FDH共同催化合成L-苯甘氨酸的转化体系优化,所得最佳的转化条件为底物浓度60 g/L,辅底物浓度50.4 g/L, LeuDH 4 U/mL, FDH 2 U/mL, NAD^+ 浓度0.14 g/L, pH 8.0, 30 °C以及160 r/min,在最优转化条件下,将该反应放大至1 L规模的转化反应,结果如图8所示,在转化进行5 h时,转化率达到99%以上, L-苯甘氨酸产量为60.2 g/L, ee值>99%,时空产率达到289 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$,为目前报道的生物法合成L-苯甘氨酸的最高产量及时空产率。从转化曲线可以看出,随着L-苯甘氨酸产量的增加,反应速率逐渐下降,除了因为酶的催化活性随时间逐渐下降外,反应体系中大量的产物结晶对酶和转化体系传质的影响也是主要原因。

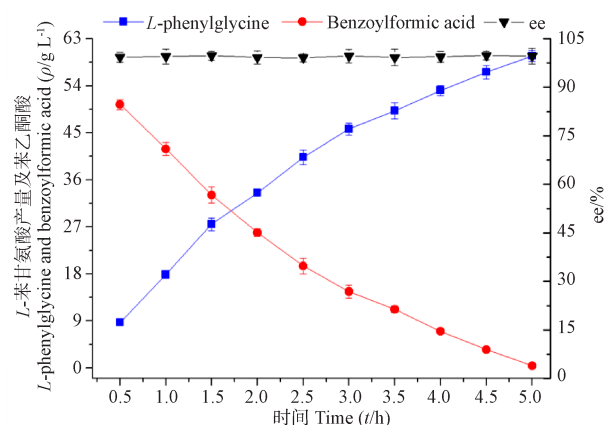


图8 1 L反应体系中L-苯甘氨酸的合成。

Fig. 8 Synthesis of L-phenylglycine on 1 L scale.

3 结论

作为一种重要的药物中间体,非天然氨基酸L-苯甘氨酸目前主要通过化学法合成,建立经济高效的生物催化合成L-

苯甘氨酸的方法具有重要的应用意义。在本研究中, 经过对辅酶再生酶的筛选, 将由LeuDH和FDH建立的辅酶再生体系应用于催化苯乙酮酸合成L-苯甘氨酸, 并对转化条件进行优化, 所得最佳转化条件为底物浓度60 g/L, 辅底物浓度50.4 g/L, LeuDH 4 U/mL, FDH 2 U/mL, NAD^+ 浓度0.14 g/L, pH 8.0, 30 ℃以及160 r/min, 并成功地将该转化体系放大至1 L规模, 经过5 h的转化反应, 转化率达到99%, L-苯甘氨酸产量为60.2 g/L, ee值>99%, 时空产率达到289 g L⁻¹ d⁻¹, 且转化体系中没有副产物残留, 转化效率优于以往L-苯甘氨酸的生物合成方法, 对L-苯甘氨酸的工业合成具有一定的指导意义。然而, 研究中发现单批转化合成L-苯甘氨酸的产量无法进一步提高的主要原因是大量产物的结晶导致酶的失活及转化体系中传质阻力增加, 因此后期进一步优化转化过程的研究应该集中在催化剂与产物的分离和回收利用上。

参考文献 [References]

- 1 Van Langen LM, Van Rantwijk F, Švedas VK, Sheldon RA. Penicillin acylase-catalyzed peptide synthesis: a chemo-enzymatic route to stereoisomers of 3,6-diphenylpiperazine-2,5-dione [J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 2000, **11** (5): 1077-1083
- 2 Ningsih F, Kitani S, Fukushima E, Nihira T. VisG is essential for biosynthesis of virginiamycin S, a streptogramin type B antibiotic, as a provider of the nonproteinogenic amino acid phenylglycine [J]. *Microbiology*, 2011, **157** (11): 3213-3220
- 3 Mast YJ, Wohlleben W, Schinko E. Identification and functional characterization of phenylglycine biosynthetic genes involved in pristinamycin biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* [J]. *J Biotechnol*, 2011, **155** (1): 63-67
- 4 Al Toma RS, Brieke C, Cryle MJ, Süßmuth RD. Structural aspects of phenylglycines, their biosynthesis and occurrence in peptide natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2015, **32** (8): 1207-1235
- 5 Croteau R, Ketchum REB, Long RM, Kaspera R, Wildung MR. Taxol biosynthesis and molecular genetics [J]. *Phytochem Rev*, 2006, **5** (1): 75-97
- 6 Landini D, Montanari F, Rolla F. Synthesis of α -aminoarylacetic acids from chloroform, arylaldehydes, and aqueous ammonia under two-phase conditions [J]. *Synthesis*, 1979, **10** (16): 26-27
- 7 徐亚荣. 苯甘氨酸、对氯苯甘氨酸合成工艺的研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2005 [Xu YR. Study on synthetic technology of phenylglycine and *p*-chlorophenylglycine [D]. Nanjing: Nanjing University of Technology, 2005]
- 8 Liu SP, Liu RX, El-Rotail AAMM, Ding ZY, Gu ZH, Zhang L, Shi GY. Heterologous pathway for the production of L-phenylglycine from glucose by *E. coli* [J]. *J Biotechnol*, 2014, **186**: 91-97
- 9 Resch V, Fabian WMF, Kroutil W. Deracemisation of mandelic acid to optically pure non-natural L-phenylglycine via a redox-neutral biocatalytic cascade [J]. *Adv Synth Catal*, 2010, **352** (6): 993-997
- 10 Fan CW, Xu GC, Ma BD, Bai YP, Zhang J, Xu JH. A novel D-mandelate dehydrogenase used in three-enzyme cascade reaction for highly efficient synthesis of non-natural chiral amino acids [J]. *J Biotechnol*, 2015, **195**: 67-71
- 11 Cheng J, Xu GC, Han RZ, Dong JJ, Ni Y. Efficient access to L-phenylglycine using a newly identified amino acid dehydrogenase from *Bacillus clausii* [J]. *RSC Adv*, 2016, **6** (84): 80557-80563
- 12 黄春辉, 林陈水. 亮氨酸脱氢酶研究进展及其工业应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, **34** (2): 16-20 [Hang CH, Lin CS. Research progress of leucine dehydrogenase and its industrial application [J]. *Amino Acids Biotic Res*, 2012, **34** (2): 16-20]
- 13 Li J, Pan J, Zhang J, Xu JH. Stereoselective synthesis of L-tert-leucine by a newly cloned leucine dehydrogenase from *Exiguobacterium sibiricum* [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2014, **105**: 11-17
- 14 Tao RS, Jiang Y, Zhu FY, Yang S. A one-pot system for production of L-2-aminobutyric acid from L-threonine by L-threonine deaminase and a NADH-regeneration system based on L-leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, **36** (4): 835-841
- 15 戚云龙, 杨套伟, 周俊平, 郑俊贤, 徐美娟, 张显, 饶志明. 多酶催化拆分DL-正缬氨酸生产L-正缬氨酸[J]. 应用与环境生物学报, 2017, **23** (6): 1015-1021 [Qi YL, Yang TW, Zhou JP, Zheng JX, Xu MJ, Zhang X, Rao ZM. Multi-enzymatic resolution of DL-norvaline for L-norvaline production [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (6): 1015-1021]
- 16 Zhou JP, Wang YL, Chen JJ, Xu MJ, Yang TW, Zheng JX, Zhang X, Rao ZM. Rational engineering of *Bacillus cereus* leucine dehydrogenase towards α -keto acid reduction for improving unnatural amino acid production [J]. *Biotechnol J*, 2019, **14** (3): 1800253
- 17 Liu WM, Ma HM, Luo JX, Shen WH, Xu X, Li S, Hu Y, Huang H. Efficient synthesis of L-tert-leucine through reductive amination using leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase coexpressed in recombinant *E. coli* [J]. *Biochem Eng J*, 2019, **14**(3): 204-209
- 18 Kragl U, Vasic-Racki D, Wandrey C. Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors [J]. *Bioprocess Eng*, 1996, **14** (6): 291-297
- 19 Ansorge MB, Kula MR. Production of recombinant L-leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus* in pilot scale using the runaway replication system *E. coli* [piet98] [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, **68** (5): 557-562
- 20 Zheng JX, Yang TW, Zhou JP, Xu MJ, Zhang X, Rao ZM. Elimination of a free cysteine by creation of a disulfide bond increases the activity and stability of *Candida boidinii* formate dehydrogenase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, **83** (2): 1-12
- 21 Fujita Y, Ramaley R, Freese E. Location and properties of glucose dehydrogenase in sporulating cells and spores of *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 1977, **132** (1): 282
- 22 Sanwal BD, Zink MW. L-leucine dehydrogenase of *Bacillus cereus* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1961, **94** (3): 430-435
- 23 Schütte H, Flossdorf J, Sahm H, Kula MR. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii* [J]. *FEBS J*, 1976, **62** (1): 151
- 24 Menzel A, Werner H, Altenbuchner J, Gröger H. From enzymes to "Designer bugs" in reductive amination: a new process for the synthesis of L-tert-leucine using a whole cell-catalyst [J]. *Eng Life Sci*, 2004, **4** (6): 573-576
- 25 Zhang CQ, Chen XX, Zou RY, Zhou K, Stephanopoulos G, Too HP. Combining genotype improvement and statistical media optimization for isoprenoid production in *E. coli* [J]. *PLoS ONE*, 2013, **8** (10): 1-11
- 26 Qi YL, Yang TW, Zhou JP, Zheng JX, Xu MJ, Zhang X, Rao ZM, Yang ST. Development of a multi-enzymatic desymmetrization and its application for the biosynthesis of L-norvaline from DL-norvaline [J]. *Process Biochem*, 2017, **55**: 104-109
- 27 Ou ZM, Shi HB, Sun XY, Shen WH. Synthesis of S-licarbazepine by asymmetric reduction of oxcarbazepine with *Saccharomyces cerevisiae* CGMCC No. 2266 [J]. *J Mol Catal B Enzyme*, 2011, **72** (3): 294-297