



DOI: 10.14188/j.ajsh.20240902001

丙谷二肽的生物合成及关键酶研究进展

程坤^{1,2}, 卫禾耕³, 杨伟强⁴, 盛清^{1*}, 杨仲毅^{2*}

- 浙江理工大学 生命科学与医药学院, 浙江 杭州 310018;
- 台州学院 药学院, 浙江 台州 318000;
- 浙江永太科技股份有限公司, 浙江 台州 317016;
- 浙江海洲制药股份有限公司, 浙江 台州 317016)

摘要: 丙谷二肽(L-alanyl-L-glutamine, Ala-Gln)是目前发现的一种在现代医疗健康领域极其重要的二肽,其进入人体后能够迅速水解成L-谷氨酰胺,促进蛋白质合成。生物合成丙谷二肽具有绿色、高效、安全的优点,主要的生物合成途径有微生物发酵法和生物催化法,其关键酶分别是L-氨基酸连接酶和 α -氨基酸酯酰基转移酶。通过敲除 *dpp*、*pep* 等基因来抑制二肽的降解,发酵法中 Ala-Gln 的最高水平为 24.70 g/L,发酵时间为 47 h。 α -氨基酸酯酰基转移酶以 L-丙氨酸甲酯和 L-谷氨酰胺为原料合成 Ala-Gln,相关研究主要集中在酶的表达体系、定向进化、固定化等领域。 α -氨基酸酯酰基转移酶可以在 25 min 转化生成 106.61 g/L 的 Ala-Gln,相较于微生物发酵法,该方法的反应时间更短,产物浓度更高,且无须 ATP 供能,是 Ala-Gln 工业化生产的首选工艺技术。

关键词: 丙谷二肽;微生物发酵;生物催化;L-氨基酸连接酶; α -氨基酸酯酰基转移酶;生物合成

中图分类号: TQ464

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2024)06-0538-13

Progress in biosynthesis and key enzymes of Ala-Gln

CHENG Kun^{1,2}, WEI Hegeng³, YANG Weiqiang⁴, SHENG Qing^{1*}, YANG Zhongyi^{2*}

- College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China;
- School of Pharmaceutical Science, Taizhou University, Taizhou 318000, Zhejiang, China;
- Zhejiang Yongtai Technology Co., Ltd., Taizhou 317016, Zhejiang, China;
- Zhejiang Haizhou Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 317016, Zhejiang, China)

Abstract: L-alanyl-L-glutamine (Ala-Gln) is an important dipeptide in modern medical and health care. After entering the human body, it can be rapidly hydrolyzed into L-glutamine, which promotes protein synthesis. The synthesis of Ala-Gln dipeptide by biological method has the advantages of green, high efficiency and safety. The main biosynthetic pathways are microbial fermentation and biocatalysis, whose key enzymes are L-amino acid ligase and α -amino acid ester acyltransferase. The degradation of dipeptide can be inhibited by knocking out genes such as *dpp* and *pep*, and the highest level of Ala-Gln in the fermentation method can reach 24.70 g/L after a fermentation time of 47 h. α -amino acid ester acyltransferase synthesizes Ala-Gln from L-alanine methyl ester and L-glutamine, and the related research mainly focuses on the enzyme expression system, directional evolution, and immobilisation. α -amino acid ester acyltransferase can con-

收稿日期: 2024-09-02 修回日期: 2024-11-21 接受日期: 2024-12-05

作者简介: 程坤(1998-),男,硕士生,研究方向为生物制药。E-mail:202230903170@mails.zstu.edu.cn

* 通讯联系人: 杨仲毅(1971-),男,教授,博士,研究方向为酶工程技术,E-mail:yangzhyi@126.com; 盛清(1966-),女,教授,博士,研究方向为生物分子的功能、天然产物的功效。E-mail:csheng@zstu.edu.cn

基金项目: 浙江理工大学绍兴生物医药研究院开放基金(SXAB202007)

引用格式: 程坤, 卫禾耕, 杨伟强, 等. 丙谷二肽的生物合成及关键酶研究进展[J]. 生物资源, 2024, 46(6): 538-550.

Cheng K, Wei H G, Yang W Q, et al. Progress in biosynthesis and key enzymes of Ala-Gln [J]. Biotic Resources, 2024, 46(6): 538-550.

vert and produce 106.61 g/L of Ala-Gln in 25 min. Compared with microbial fermentation, this method has a shorter reaction time, higher product concentration, and does not need ATP for energy supply, making it the preferred process technology for industrial production of Ala-Gln.

Key words: L-alanyl-L-glutamine (Ala-Gln); microbial fermentation; biocatalysis; L-amino acid ligase; α -amino acid ester acyltransferase; biosynthesis

0 引言

L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(L-alanyl-L-glutamine, Ala-Gln)又称丙谷二肽(结构式见图1),CAS号为39537-23-0,是一种稳定且水溶性很好的二肽^[1],其进入人体后能够迅速水解成L-谷氨酰胺,后者是人体肌肉中含量最丰富的游离氨基酸^[2]。Ala-Gln溶解度极高(568 g/L),且在高压灭菌条件下稳定^[3],已成为食品、医疗保健和制药行业中L-谷氨酰胺的替代物。Ala-Gln在维持身体的生理功能中非常重要,具有提高肠道细胞活性、免疫功能,促进蛋白及酯类的合成,调节血液中氨和糖浓度的作用。临床上可用于肠道疾病^[4-6]、肺组织损伤^[7]、角膜内皮损伤^[8]的预防和治疗。尤其是作为肠外营养用药^[9],Ala-Gln已经像生理盐水和葡萄糖一样,成为救护病人的必需品,在应对突发性创伤,提高军队战斗力上具有重要作用。另外,Ala-Gln和其他氨基酸及活性成分,如果胶、蜂胶、鱼油的混合物,可以被开发为抗疲劳和抗压力的功能食品。

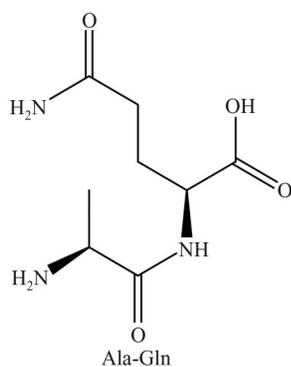


图1 丙谷二肽的结构式

Fig. 1 Molecular structure of Ala-Gln

Ala-Gln由德国Fresenius AG研制并生产,其20%静脉注射液在德国的商品名为Dipeptamin;国内的商品名为20% Dipeptamin(力肽)。由于Ala-Gln应用价值高,其产业规模逐年扩大。但是近年来原料价格的增高以及安全环保要求的提高,使得Ala-Gln的市场价格和生产成本越来越高,迫切需要更高效的生产技术。目前大多采用化学合成法进行Ala-Gln工业化生产,工艺过程需要用到保护和脱保

护反应以及大量的酸碱。而Ala-Gln的生物合成技术不断成熟,随着酶催化效率的不断提高,产物浓度超过了100 g/L,具有成本和工艺上的优势。近年来,工业生物催化技术迅速普及推广,专业酶制剂公司不断涌现,酶催化技术被常规的化学合成企业所接受和掌握,Ala-Gln生物合成达到了工业化应用的水平。

1 生物合成Ala-Gln的技术路线

目前,Ala-Gln的生物合成过程是通过L-谷氨酰胺与L-丙氨酸或其衍生物,在酶催化下合成Ala-Gln。在反应过程中,两个氨基酸或其衍生物都无须保护,反应直接得到Ala-Gln,无须额外的脱保护等合成步骤。根据L-丙氨酸及其衍生物的不同,当前生物合成Ala-Gln研究的主流反应路线见图2。

1.1 L-丙氨酸与L-谷氨酰胺直接缩合

L-谷氨酰胺与L-丙氨酸在非酶促条件下也能发生缩合反应。在模拟生命起源的实验中,5 kV电离条件下的微滴表面可以发生两种氨基酸的缩合,并检测到Ala-Gln的产生^[10]。但这样的合成效率是低效和无选择性的,会伴随产生许多其他缩合产物。而在生物体中,该反应由L-氨基酸连接酶(L-amino acid ligase, Lal)催化,并需要ATP的水解来提供能量(见图3)。ATP在反应过程中与主原料丙氨酸和谷氨酰胺是等当量的,但在原料成本方面,ATP的价格显著高于这两个氨基酸的价格。为降低生产成本,一般在反应过程中引入ATP再生系统,或者利用微生物发酵过程代谢产生ATP。引入ATP再生系统一般采用离体的酶催化反应形式进行,酶的形式包括游离酶或者全细胞、固定化细胞和固定化酶等,所采用的ATP再生系统有乙酸激酶^[11,12]、多聚磷酸激酶^[13,14]等。比如,有学者利用氨基酸连接酶和乙酸激酶构建双酶偶联体系,将乙酰磷酸作为ATP再生的底物,分别合成了32.5 mmol/L(7.06 g/L)和24.3 mmol/L(5.28 g/L)的Ala-Gln^[11,12];也有学者直接以ATP为底物,生成22.4 mmol/L(4.87 g/L)的Ala-Gln^[15]。多聚磷酸激酶则多以无机聚磷酸盐作为ATP再生的底物,如三聚磷酸钠、六偏磷酸钠等。有学者通过外源添加ATP,以L-丙氨酸和L-谷氨酰胺为底物合成了3.70 g/L的Ala-Gln,且产

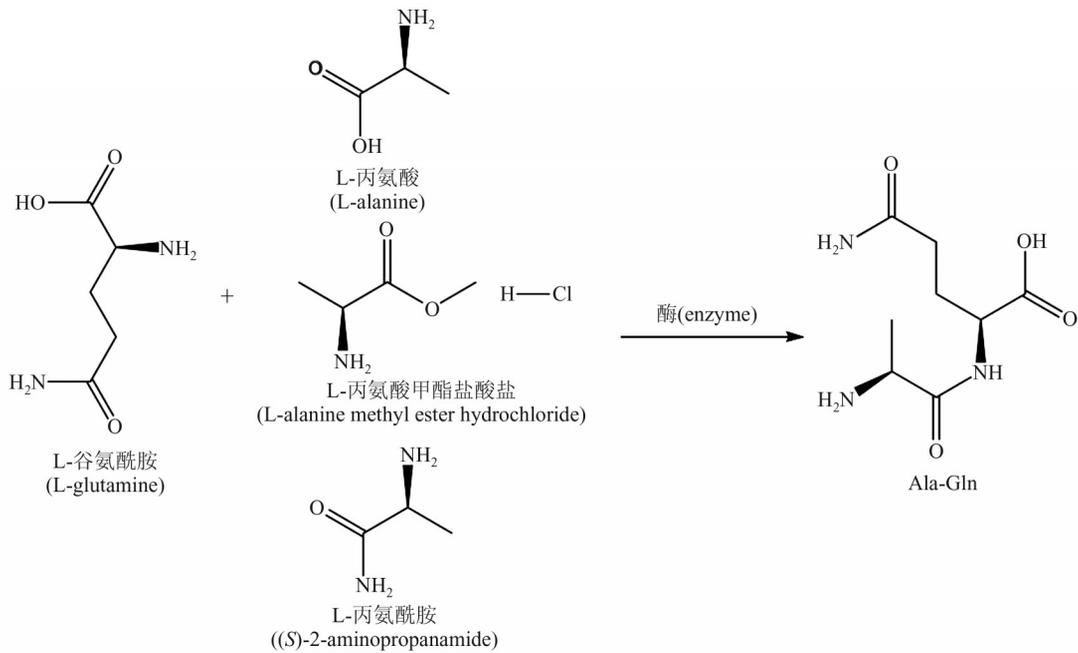


图2 L-丙氨酸及其衍生物生成 Ala-Gln 的路线

Fig. 2 Route for the production of Ala-Gln from L-alanine and its derivatives

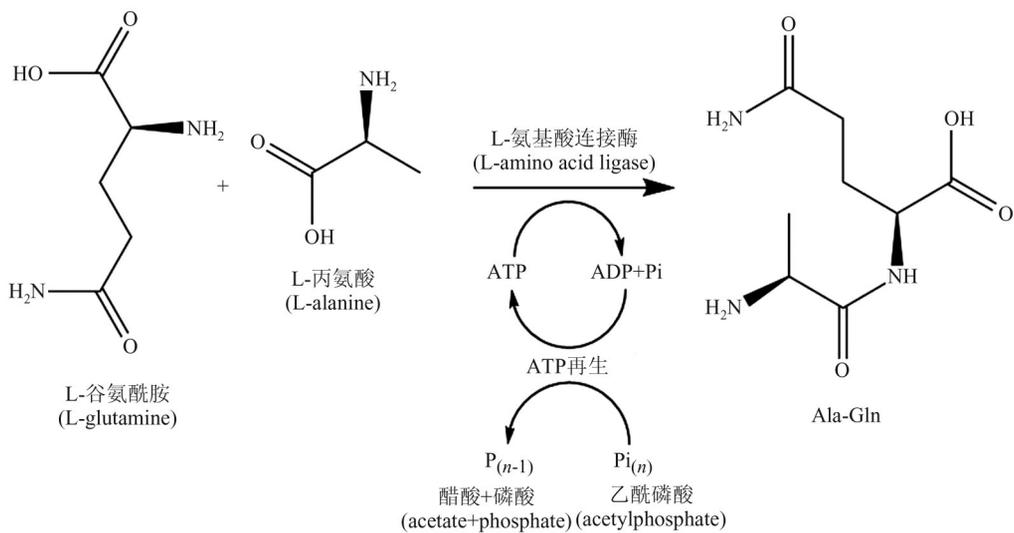


图3 L-丙氨酸与L-谷氨酰胺合成 Ala-Gln

Fig. 3 Synthesis of Ala-Gln from L-alanine and L-glutamine

生了丙丙二肽混合物^[16]。对比可知,外源添加 ATP 成本较高,且产量不如引入 ATP 再生系统。Ala-Gln 合成过程所需的 ATP 也可由微生物发酵过程代谢产生,这种方法通常将 Lal 催化的 Ala-Gln 合成与 ATP 生成整合到同一种微生物体内,在发酵过程中合成 Ala-Gln。该方法还有一个优势是所需的丙氨酸、谷氨酰胺也可由该微生物发酵产生,进一步降低成本。比如,有学者将谷氨酰胺合成模块和 Ala-Gln 的合成模块有机结合起来,成功构建了一种用于生产 Ala-Gln 的菌株,优化全细胞催化条件和体系后,利用 L-谷氨酸和 L-丙氨酸,每 3 h 补加葡萄糖,产生

了 65.6 mmol/L (14.25 g/L) 的 Ala-Gln,转化率为 65.6%^[17]。相较于前述研究,产物浓度有很大提高,但仍有大量副产物。有学者利用 Lal 突变体 JKYPQ3,并进一步敲除 *dpp* 和 *pep* 基因,以降低二肽降解活性,通过葡萄糖直接发酵 47 h,最终生成了 24.70 g/L 的 Ala-Gln 以及唯一二肽副产物丙丙二肽^[18]。这是无须外源添加底物就直接生成 Ala-Gln 的报道。也有报道将 Lal 转染到动物细胞中,在细胞培养过程中加入丙氨酸和谷氨酰胺,收集细胞裂解液,并提取 Ala-Gln,但产物浓度较低 (2.2 mmol/L),且两个底物氨基酸的利用率不高^[19]。利用 Lal 生产

Ala-Gln的技术汇总如表1所示。

1.2 L-丙氨酸甲酯与L-谷氨酰胺缩合

以丙氨酸酯衍生物为原料,可在酶促下直接合成Ala-Gln,反应过程无须ATP提供能量(见图4)。催化该反应的酶为 α -氨基酸酯酰基转移酶(α -amino acid ester acyltransferase, AET)。有学者研究了971种微生物,发现有107株细菌及16株酵母菌具有以丙氨酸甲酯以及谷氨酰胺为底物合成Ala-Gln的能力,其中短稳杆菌(*Empedobacter brevis*)ATCC14234的效率最高。他们从中纯化到了 α -氨基酸酯酰基转移酶EAET,该酶分子量为150 kDa,为同源二聚体。该酶在2 h内催化合成了83 mmol/L的Ala-Gln,对丙氨酸甲酯的收率超过了80%^[20]。

短稳杆菌 ATCC14234 属于拟杆菌门(Bacteroidetes)。有学者从拟杆菌门中的泗阳鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium siyangensis*) AJ2458 中克隆到另一个AET(SAET),相比于EAET,其催化Ala-Gln合成的能力更好。分析表明,SAET的分子量为115 kDa,也是同源二聚体^[21]。

有研究利用噬菌体 λ 红重组酶系统破坏了大肠杆菌宿主菌的 *pepD* 基因,以降低宿主细胞对Ala-Gln产物的降解。其利用该宿主菌过表达SAET,并用该工程菌进行全细胞转化,在40 min内生成69.70 g/L的Ala-Gln,转化率达到61.26%^[22]。相比于用Lal生产Ala-Gln,该方式的产物浓度有了很大提高。

有学者在组成型表达SAET的基础上,优化了密码子和mRNA二级结构^[23],也有学者敲除了大肠杆菌宿主菌的肽酶D基因 *pepD* 和氨肽酶基因 *pepN*^[24]。文献[24]利用大肠杆菌在发酵过程中产生Ala-Gln,在最优条件下发酵36 h(2 160 min),Ala-Gln的产量达到14.51 g/L(转化率为33.39%)。有学者利用CRISP-Cas9技术敲除了多个与Ala-Gln降解相关的基因(如 *pepA*、*pepB*、*pepD*、*pepN*、*dpp* 和 *dtg* 等),产物的降解速率可以下降48%,但全细胞转化时产物浓度低于10 g/L^[25]。还有学者敲除了肽酶基因 *pepA*、*pepB*、*pepD*、*pepN*,通过全细胞转化技术,获得了61.5 g/L的产物,转化率达到94.5%^[26]。

为提高利用大肠杆菌合成Ala-Gln的效率,有学者对重组大肠杆菌进行高密度发酵,通过探究pH、补料种类及方式筛选出最佳发酵策略,采用溶氧反馈补料培养27 h,OD₆₂₀达到58,诱导后3 h,OD₆₂₀接近70,并用OD₆₂₀为0.7的高密度发酵菌体催化合成Ala-Gln,5 min内产物浓度达到34.56 g/L,底物转化率为53.03%^[27,28]。有学者比较了EAET和SAET,并用SAET工程菌,以L-丙氨酸甲酯盐酸盐及L-谷氨酰胺为底物合成78.20 g/L的Ala-Gln,转化率为75.00%,反应约40 min即达到稳定状态,且后续发现Ala-Gln并未有较大降解^[29]。有学者将SAET质粒转化到大肠杆菌不同感受态细胞中,筛选出最佳菌株Origami 2-pET29a(+)-SsAET

表1 利用Lal生产Ala-Gln的方法比较

Table 1 Comparison of methods for producing Ala-Gln using Lal

酶	酶来源	生产菌株	生产形式	底物	转化率/%	浓度/(g·L ⁻¹)	时间/min	文献
(YwfE,ack) ^a	枯草芽胞杆菌、丙酮丁醇梭菌	大肠杆菌	纯化酶转化	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺	65.00 ^b	7.06	480	[11]
(Lal,ack) ^a	枯草芽胞杆菌、丙酮丁醇梭菌	大肠杆菌	纯化酶转化	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺	81.00 ^b	5.28	960	[12]
(YwfE,PPK2) ^a	枯草芽胞杆菌、泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	纯化酶转化	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺	64.10 ^c	4.17	420	[13]
Lal	枯草芽胞杆菌	大肠杆菌	纯化酶转化	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺	74.67 ^b	4.87	840	[15]
Lal	枯草芽胞杆菌	大肠杆菌	纯化酶转化	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺	56.78 ^b	3.70	960	[16]
Lal	枯草芽胞杆菌	大肠杆菌	全细胞催化	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺	65.60 ^b	14.25	1 080	[17]
Lal	枯草芽胞杆菌	大肠杆菌	直接发酵法	葡萄糖	11.50 ^d	24.70	2 820	[18]
Lal			全细胞催化	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺	4.40 ^b	0.48	240	[19]

注:a表示反应需要双酶偶联;b表示相对于L-谷氨酰胺的转化率;c表示相对于L-丙氨酸的转化率;d表示相对于葡萄糖的转化率

Note: a. reaction requires double enzyme coupling; b. conversion rate relative to L-glutamine; c. conversion rate relative to L-alanine; d. conversion rate relative to glucose

(OPA)进行反应,生成了79.92 g/L(367.9 mmol/L)的产物,转化率为61.32%^[30],在此基础上优化反应条件,利用OPA将L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺底物转化为106.61 g/L(490.8 mmol/L)的产物,转化率达到81.80%^[31]。

另外,大肠杆菌中的内毒素和多种抗生素以及有毒诱导剂的使用给Ala-Gln的临床应用带来了潜在的生物安全风险,为克服这个缺点,一些研究者将研究方向转向了毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。为了消除酵母表达中的糖基化,有研究者提出了两种策略:一是目的基因的胞内表达;二是糖基化位点的点突变。研究者构建了一种去除了天然信号肽的新菌株K3A1,相较于原始菌株,K3A1的活性提升了10%,且Ala-Gln的时空产率达到1.74 g/(L·min)^[32]。有研究者将AET基因转入酵母,发现启动子RS02207比AOX1启动子表达的SAET活性高,随后利用超滤酶液转化Ala-Gln,生成的Ala-Gln浓度为50.50 g/L^[33]。有研究者将SAET克隆到毕赤酵母中,利用重组酵母菌株在pH 9.0、10℃反应条件下,将L-谷氨酰胺与L-丙氨酸甲酯盐酸盐转化为Ala-Gln,随后通过絮凝、离子交换树脂吸附及浓缩结晶等步骤,从1 L反应液中精制获得了51.8 g的Ala-Gln纯品,收率接近90%^[34]。

为降低生产成本,提高生产效率,有研究者将AET表达到酵母细胞的表面,并利用该重组酵母细胞进行催化反应,得到24.70 g/L的Ala-Gln,该酵母细胞可以通过离心分离重复使用^[35]。有研究者则通过密码子优化构建了酵母菌株GPAp,在最佳条件下,GPAp生成的Ala-Gln的最高浓度为49.50 g/L,证明加入半胱氨酸或苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)会提高酶的催化活性;将毕赤酵母固定到琼脂珠上,该固定化细胞可以连续反应十批^[36]。有研究者将表达SAET的大肠杆菌包埋到海藻酸钠中与钙离子交联,从而进行固定化,

发现诱导前固定化的细胞比诱导后固定化的细胞活性要高20%;该固定化细胞在批次反应方式中可以反复使用10次,也可以采用循环流动床反应器(circulating fluidized bed reactor, CFBR)和连续流固定床反应器(continuous-flow packed-bed reactor, CFPBR)两种形式进行反应,在CFPBR中,每毫升固定化酶每分钟可生成2.79 g的Ala-Gln^[37]。但是该研究只给出了30 min的连续运行数据,且在最优条件下产物浓度低于30 g/L,海藻酸钙材料的更长期运行机械性能值得怀疑。有学者利用“一锅法”将金属骨架材料中的类沸石咪唑酯骨架材料与原料细胞混合液直接混合,将细胞包埋在载体结构内部,很好地实现了细胞固定,利用固定化细胞反应30 min,产生13.65 g/L的Ala-Gln,用纯水冲洗固定化细胞后,可重复利用7次,其催化活性剩余67%,稳定性良好^[38]。

上述固定化都是将表达AET的细胞固定到载体上,而将游离酶直接固定到载体上的报道较少。有学者通过将AET工程菌的悬液进行均质破碎,并利用所得上清酶液过流固定化酶载体,成功制备了AET的固定化酶,用于约300 mmol/L谷氨酰胺和0.75 mol/L L-丙氨酸甲酯盐酸盐的转化,经70 min后转化率在97%以上,固定化酶可多次回收利用^[39]。有学者将α-氨基酸酯酰基转移酶与微孔聚合物结合,形成酶复合体后加入反应体系中,反应结束后,转化率为91.4%^[40]。利用固定化酶制备Ala-Gln代表了该产品生产技术的发展方向,但需要有更多的进展报道。丙氨酸甲酯与L-谷氨酰胺缩合路线比较如表2所示。

1.3 L-丙氨酸甲酯与L-谷氨酰胺缩合

目前对于丙氨酸甲酯和谷氨酰胺缩合生成Ala-Gln(见图5)的报道较少,有学者利用重组大肠杆菌表达AET基因,在研究底物特异性时,将酶液加入丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺、EDTA混合溶液中,

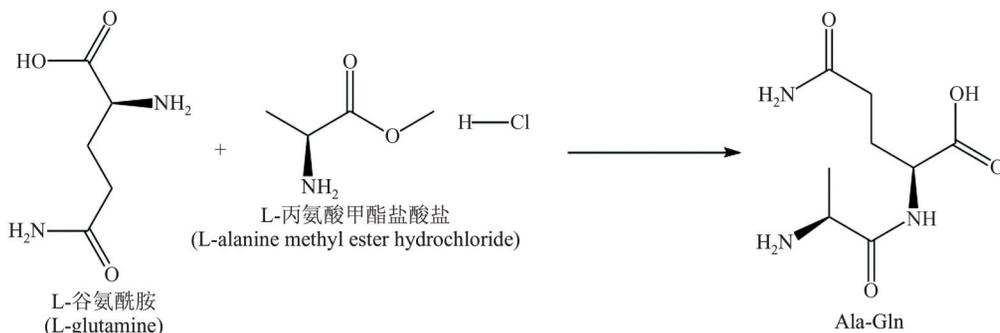


图4 L-丙氨酸甲酯与L-谷氨酰胺合成Ala-Gln

Fig. 4 Synthesis of Ala-Gln from L-alanine methyl ester and L-glutamine

表2 利用AET生产Ala-Gln的方法比较
Table 2 Comparison of methods for producing Ala-Gln using AET

酶	酶来源	生产菌株	生产形式	底物	转化率/%	浓度/(g·L ⁻¹)	反应时间/min	文献
EAET	短稳杆菌	短稳杆菌	纯化酶转化	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	83.00 ^a	18.03	120	[20]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	直接发酵法	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	61.26 ^b	69.70	40	[22]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	直接发酵法	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	3.53 ^b	0.38	90	[23]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	直接发酵法	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	33.39 ^b	14.51	2 160	[24]
AET	脑膜败血伊丽莎白菌	大肠杆菌	游离细胞	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	94.50 ^b	61.50		[26]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	全细胞催化	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	53.03 ^b	34.56	5	[27]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	纯化酶转化	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	75.00 ^b	78.20	40	[29]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	游离细胞	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	61.32 ^b	79.92	60	[30]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	全细胞催化	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	81.80 ^b	106.61	25	[31]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	毕赤酵母	直接发酵法	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺		50.50		[33]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	酿酒酵母	全细胞催化	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺		24.70	60	[35]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	毕赤酵母	全细胞催化	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	56.98 ^b	49.50	40	[36]
SAET	泗阳鞘氨醇杆菌	大肠杆菌	固定化细胞	L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺	78.54 ^b	13.65	30	[38]

注:a表示相对于L-丙氨酸甲酯盐酸盐的转化率;b表示相对于L-谷氨酰胺的转化率

Note: a. conversion rate relative to L-alanine methyl ester hydrochloride; b. conversion rate relative to L-glutamine

最终生成7.6 mmol/L的Ala-Gln^[41]。

1.4 其他路线

除上述两种酶外,利用其他酶也能生成Ala-Gln,有学者以L-丙氨酸甲酯盐酸盐为起始物,通过引入保护基、催化肽键合成、脱保护基三步实现了Ala-Gln的合成^[42]。为了有效解决纳米晶纤维素固定载体在连续反应过程中面临的再循环难题,并进一步提升酶的稳定性,有学者将四水氯化亚铁、壳聚糖和六水氯化铁结合在纳米晶纤维素上,开发了一种新型的磁性纳米晶纤维素来固定酶,以深共晶溶剂(deep eutectic solvents, DES)为介质,利用固定化木瓜蛋白酶,以Z-丙氨酸甲酯盐酸盐和L-谷氨酰胺为原料,高效地酶促合成Z-丙谷二肽^[43]。反应结束后只需要利用磁性将固定化酶分离后冲洗即可,该方法提高了酶的pH及温度稳定性,但产物的合成路线仍较复杂,在工业应用上不具有优势。

2 生物合成Ala-Gln的关键酶

酶的功能由组成的氨基酸的种类、数目、排列顺序和肽链空间结构共同决定^[44],上述催化L-丙氨酸

或L-丙氨酸甲酯盐酸盐与L-谷氨酰胺合成Ala-Gln的酶分别为L-氨基酸连接酶和 α -氨基酸酯基转移酶。

2.1 L-氨基酸连接酶

利用未保护的L-丙氨酸和L-谷氨酰胺直接合成Ala-Gln是最短的合成路线,然而自然界中催化小肽形成的酶多以D-氨基酸为底物,或者催化形成二肽以上的寡聚肽。具有该催化L-氨基酸形成 α -二肽活性的酶直到2005年才由Tabata等^[45]通过虚拟筛选发现,该酶来自于枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*),由*YwfE*基因编码,也称为BacD。BacD属于ATP-grasping enzyme超家族,在分类上为EC 6.3.2.28。

随后,BacD的结构也得到鉴定^[46]。该酶分子量为43 416.71 Da、含有394个氨基酸、具有3个结构域:N端结构域(Glu2-Gly126)、中间结构域(Ala127-Leu229)以及C端结构域(Gln230-Gly471),与D-丙氨酰-D-丙氨酸连接酶(D-alanine-D-alanine ligase, Ddl)的序列相似性达25%。该酶的氨基酸结合腔起作用的位点主要有N端结构域

(Leu12、Gly13、Tyr75、Trp76、Asn108、Glu109 和 Leu110)、中心结构域(Ala183 和 Ser184)、C 端结构域(Glu273、His276、Trp332 和 Met334),且 Tyr75 与 Ser184 为保守位点。BacD 催化合成 Ala-Gln 的机理与 Ddl 较相似,首先 Lal 通过 ATP 水解为 ADP,催化未保护的 L-氨基酸形成二肽,具体为 ATP 的磷酸基团被攻击形成酰基磷酸中间体;然后中间体受到亲核攻击,形成四面体过渡态中间体;最后在镁离子的帮助下崩解为产物并释放出磷酸基团(见图 6)。

目前,报道的用于二肽形成的 L-氨基酸连接酶数量有限,其中报道较多的是首个 Lal 结构,即 YwfE(BacD),来自枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* 168),RSp1486a 来源于青枯雷尔氏菌(*Rastonia solanacearum* JCM 10498)^[47],BL00235 来源于地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis* NBRC 12200),RizA 来源于枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* NBRC 3134)^[48],TabS 来源于丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* NBRC 14081)^[49],BaLal_16 来源于解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* strain ZJU-2011)^[50],PSPPH_4299^[51]来源于丁香假单胞菌菜豆致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A),Plu1440 来源于发光杆菌亚种(*Photobacterium luminescens* subsp. *laumondii* TT01)^[52]。这些酶底物专一性各不相同,形成的产物也不同。上述几种酶中,YwfE(BacD)、RSp1486a、BaLal_16 和 PSPPH_4299 具有明确的 Ala-Gln 合成能力。L-氨基酸连接酶具有广泛的底物特异性,根据 L-氨基酸连接酶的结构信息以及催化机理,一些学者对其进行了理性设计,以提高酶的催化选择性和催化效率。比如,将 BL00235 的 Lal 的 Pro85 点突变为 Phe 或 Tyr 后,该酶具有了合成 Met-Gly 的能力^[53];把 TabS 的 Ser85 以及 His294 突变为 S85T 和 H294D 后,其合成 Pro-Gly 的能力得到大幅度提高^[52];将 BacD 的

L110 突变为 Phe 或者 Tyr,并将 N108 突变为 Phe, BacD 合成 Ala-Gln 的活性提高了 1.87 倍^[54]。由于蛋白内部存在疏水性通道,通过定点突变改变位点氨基酸的大小,改变空间位阻,从而使底物更好地进入活性中心。这些改造都是围绕着二肽 C 端氨基酸周围的残基进行的,这可能是一个非常有效和重要的活性调节位点,有研究指出,通过定点突变改变位点氨基酸的大小,改变空间位阻从而改变“门”的大小,可以提高活性中心对底物的接受性,进而更好地增强二肽合成活性^[50]。

2.2 α-氨基酸酯基转移酶

α-氨基酸酯基转移酶是一种二肽连接酶。其基因由 1 851 个碱基对组成,含 616 个氨基酸,分子量为 150 kDa。Yokozeki 等^[20]从短稳杆菌中发现了 AET 利用丙氨酸甲酯与谷氨酰胺生成 Ala-Gln 的能力,其与 Lal 一样,都能催化多种酰基供体和亲核试剂形成小肽,具有广泛的底物特异性。

α-氨基酸酯基转移酶属于丝氨酸水解酶超家族,是一种二肽连接酶。其基因由 1 851 个碱基对组成,含 616 个氨基酸,分子量为 150 kDa,有两个亚基(75 kDa),含有保守基序 GxSYxG,催化三联体为 Ser-Asp-His。AET 由 Peptidase S15 功能域(44-331)和 PepX-C 催化结构域(382-613)两个结构域组成,在合成 Ala-Gln 反应中,AET 以 L-丙氨酸甲酯为酰基供体,以 L-谷氨酰胺为亲核试剂,亲核试剂攻击丙氨酸甲酯并催化产生 Ala-Gln,除此之外,还可催化其他多种酰基供体与亲核试剂结合形成小肽,具有广泛的底物特异性。在发现 AET 后,利用其底物特异性广且酶活稳定等特点,研究者们也未停止对 AET 的研究探索,主要有以下几种改造方式:敲除肽酶基因(如 *pepA*、*pepB*、*pepD*、*pepN* 这些肽酶具有降解二肽的作用;*dpp* 和 *dtp* 可将二肽转运回胞内^[55]),构建 *pep*、*dpp*、*dtp* 缺陷菌株;优化基因的密码子和 mRNA 结构,使其 GC 含量更接近大肠杆

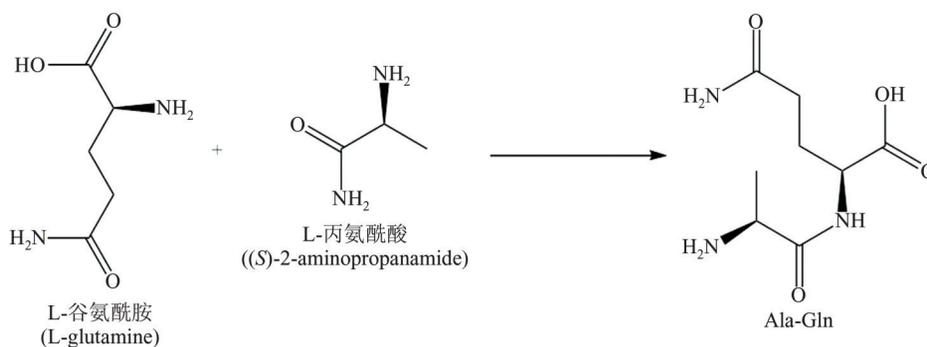


图 5 L-丙氨酰胺与 L-谷氨酰胺合成 Ala-Gln

Fig. 5 Synthesis of Ala-Gln from L-alanamide and L-glutamine

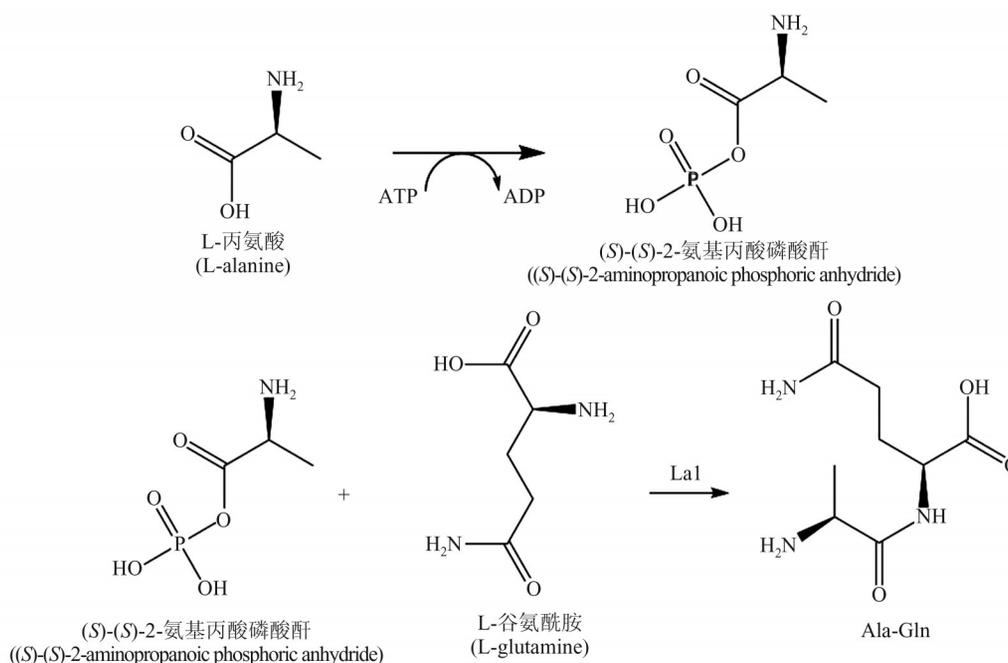


图6 L-氨基酸连接酶催化的Ala-Gln合成反应机理

Fig. 6 Mechanism of synthesis of Ala-Gln catalyzed by L-amino acid ligase

菌;将目的基因转入不同的感受态细胞,筛选出最佳菌株,感受态细胞有 BL21、Shuffle T7、Origami 2、Rosetta-gamiB (DE3)pLysS 等;原核表达系统会产生内毒素等有害物质,利用真核表达系统去除内毒素的影响(如导入酿酒酵母或毕赤酵母);通过定点突变筛选出酶活较好的突变株^[56];利用不同方式将酶进行固定化,增强酶对外界环境包括温度、pH 等的耐受性,提高酶活。

目前发表的用于 Ala-Gln 合成的 AET 主要来源于短稳杆菌的 EAET 以及来源于泗阳鞘氨醇杆菌的 SAET。这两种 AET 都带有一段信号肽序列。信号肽是广泛存在于真核及原核生物中的一段短肽链^[57],一般位于 N 端,由 15~30 个氨基酸组成,其功能是引导前体蛋白的折叠,促进蛋白的跨膜转运^[58]。信号肽本身并没有严格的专一性,可将其他物种的信号肽克隆到表达宿主中,从而协助宿主表达蛋白,但信号肽对不同异源蛋白的分泌效率是有差别的^[59]。AET 的外源表达通常可溶性较差,为提高表达效率,许多学者尝试了在酵母中进行 AET 的表达。有学者从 *S. siyangensis* SY1 中筛选出过表达 SsAet,导入 Origami 2 感受态,构建重组大肠杆菌 OPA,优化反应条件,产生 106.61 g/L 的 Ala-Gln^[31]。从该研究中可推测出,对于发酵,选择能较好促进二硫键形成的感受态细胞作为表达宿主,通过优化菌体发酵的诱导时间、温度、诱导剂浓度,并在菌体的最佳生长阶段进行诱导,能够显著提高表

达效率。而对于反应来说,细胞破碎的功率及时间、缓冲液的种类、反应的 pH、温度、底物浓度配比等都是影响反应程度的因素。

也有学者尝试去除 AET 的信号肽进行直接表达,并取得了进展。比如,文献[32]中对比了酿酒酵母和毕赤酵母,构建出敲除了天然信号肽的菌株 K3A1(酿酒酵母),相对于原始菌株,活性提高了 10%,Ala-Gln 的时空产率为 1.74 g/(L·min)。利用丙氨酸扫描和饱和突变来改造目的基因的相关位点也是提高菌体表达效率的一种方法。

3 生物合成 Ala-Gln 的生产工艺

3.1 Ala-Gln 生产模式的选择

根据 Ala-Gln 生产过程中产物形成的步骤,生物合成 Ala-Gln 的生产工艺可以分为酶工程工艺和发酵工艺两类。发酵工艺是 Ala-Gln 产生菌在发酵过程中分泌形成 Ala-Gln 产物,通过固液分离及后提取技术精制得到产品。尤其是文献[18]中报道的技术,经过酶切、PCR 扩增、替换启动子等改造的 Lal 突变体 JKYPQ3 可直接以葡萄糖为主要原料,发酵形成 Ala-Gln,不需要在发酵过程中额外加入丙氨酸和谷氨酰胺,可以大大降低产物形成阶段的原材料成本。

酶工程工艺是以 L-丙氨酸(甲酯盐酸盐)及 L-谷氨酰胺为原料,直接在酶的催化下反应形成产物,并经下游分离纯化得到 Ala-Gln 产品。相比于游离

酶,全细胞酶尤其是酵母菌体具有一定的强度,可以多次利用。如有学者将SsAET重组于酵母中,并构建了絮凝自固定化细胞催化合成Ala-Gln,酶活与游离酶相当,固定化后的细胞在重复利用五批次后,酶活下降了15%^[31]。但这种反复使用往往是不够的,尤其放大后在搅拌桨的剪切下还是会有非常多胞内物质释放到反应液中,降低了菌体酶的活性,增加了产物提取的难度。相对于游离细胞,固定化细胞具有更好的pH和温度稳定性,固液分离可操作性有所提高。有学者利用海藻酸钙制作固定化细胞,提出了填充管状反应器中固定化细胞的连续生产策略,在最佳反应条件下,Ala-Gln的转化率为51%^[37];有学者利用琼脂制备固定化细胞,经过10轮反应后,酶活力仍有57.03%^[60];还有学者利用类沸石咪唑酯骨架材料为载体制备固定化细胞^[61]。

上述固定化细胞可被重复利用,但其制作过程繁琐,不适于放大操作。随着酶制剂工业化生产技术的成熟及生产成本的降低,直接用冻存的液体游离酶进行反应成为常规操作。更加理想的方式是采用高聚物载体固定化的酶作为催化剂,可以减少反应液中的杂质,还能实现酶的反复多次应用,降低生产成本。目前尚未见使用固定化酶法生产Ala-Gln能够达到常规载体重复使用次数的相关报道,仅有研究制备了酶复合物进行反应,且制成的酶复合物可重复利用^[40]。也有学者采用了载体固定化的酶^[39],但其使用效率及反复使用次数都未报道。

3.2 Ala-Gln的分离提取技术

Ala-Gln生物合成路线及生产模式的选择与分离提取技术紧密相关。化学合成的Ala-Gln杂质种类少,产物浓度高,提取相对简单。以中国专利CN102731613^[62]为例,该专利在化学合成步骤后减压浓缩掉氨水,将得到的Ala-Gln粗品溶于水,利用甲醇滴加降温析晶,过滤得到Ala-Gln精品,总收率82%,高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的纯度达到99.6%。

但是酶催化产生的Ala-Gln反应液中往往有较多未反应完全的丙氨酸和谷氨酰胺,以及酶制剂中带入和降解产生的许多蛋白、多肽等生化物质,其提取工艺往往比化学合成路线的提取复杂。例如,中国专利CN104561202^[34]在反应后用阳离子交换树脂吸附产物,并用1%氨水洗脱,浓缩后加甲醇降温结晶得到粗品,要对粗品进行精制,得到纯品,包括结晶、脱色、烘干粉碎等步骤,精制收率为87%,产品纯度为99.5%。有学者利用热带假丝酵母发酵去除Ala-Gln粗品中残留的氨基酸,后续经过过滤

除盐,浓缩结晶得到纯品Ala-Gln,菌体可重复利用3次^[63]。也有学者通过技术手段降低了成本,提高了生产效率。如将脱盐的L-丙氨酸甲酯盐酸盐加入L-谷氨酰胺和 α -氨基酸酯酰基转移酶的混合溶液,搅拌反应得到Ala-Gln,由于反应过程中的盐分被分离,减少了反应的高盐废水的产生量,降低了处理成本,在反应中,L-丙氨酸酯的种类可多样化^[64]。

采用全发酵工艺生产的Ala-Gln在发酵液中含量相对较低、杂质组分最多,尤其是含有与产物性质相近的二肽和寡肽等组分。文献中尚未检索到相关提取方法,但根据Ala-Gln的理化性质,以及产品质量要求,推测其分离提取包含以下过程:发酵液→固液分离(絮凝、离心、陶瓷膜、过滤等)→脱盐与浓缩(超滤除大分子物质,纳滤除盐与浓缩)→离子交换与洗脱→浓缩结晶得到粗品→精制。由于L-氨基酸连接酶底物专一性广,不同微生物菌株发酵产生的杂质组分不同,通过上述工艺过程得到的粗品杂质含量液不同,如果含有非常相近的组分,则精制过程可能需要引入层析等步骤。

3.3 Ala-Gln的工艺路线比较

相比于其他路线,全发酵路线的主原料仅为葡萄糖,合成Ala-Gln所需的丙氨酸及谷氨酰胺都在发酵过程中由微生物自身合成,该方法符合当下合成生物学的理念,在产物形成阶段具有成本最低的优势。但该路线提取得到高纯度Ala-Gln的工艺复杂,难度比其他路线大,收率也会低于其他路线。同时,该路线属于生物制药领域,适合发酵企业,而对于化学合成企业则有较高的技术门槛。同时,作为注射用的Ala-Gln要求去除内毒素等污染,这对发酵菌种及提取工艺提出了进一步的要求。

酶催化路线包括游离酶、全细胞、固定化细胞、固定化酶技术,由于所需酶制剂可从专业公司采购,发酵和化学合成企业都能实施该工艺。其中,相比于L-氨基酸连接酶,AET催化的反应具有更高的产物浓度,所需反应时间也更短,采用固定化AET进行Ala-Gln生产,更适合发酵及合成企业的产业化实施。催化工艺路线比较见表3。

4 结束语

合成生物学在多个领域都受到了高度重视,以Lal为基础,利用全发酵法合成Ala-Gln,目前可达到24.70 g/L。进一步降低发酵的杂质组分,探索发酵法Ala-Gln的提取工艺,有助于降低Ala-Gln的制造成本,进一步促进Ala-Gln在医疗健康领域的应用。而利用AET催化的Ala-Gln合成反应时间短、产物

表3 生产Ala-Gln的工艺路线比较
Table 3 Comparison of process routes for producing Ala-Gln

比较项	工艺路线				
	化学合成	游离酶/全细胞催化	固定化细胞催化	固定化酶催化	发酵合成
主要原料	D- α -氯丙酰氯、L-谷氨酸	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺、(ATP、多聚磷酸) ^a	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺、(ATP、多聚磷酸) ^a	L-丙氨酸、L-谷氨酰胺、(ATP、多聚磷酸) ^a	葡萄糖
酶的制备 ^b		工程菌发酵 菌体收集与破壁	工程菌发酵 菌体收集 细胞固定化	工程菌发酵 菌体收集与破壁 酶固定化	—
		(丙氨酸甲酯合成) ^c 酶转化反应	(丙氨酸甲酯合成) ^c 酶转化反应	(丙氨酸甲酯合成) ^c 酶转化反应	—
产物形成	化学合成				生产菌发酵
产物提取	结晶、重结晶	离心、离子交换、结晶、重结晶	离子交换、结晶、重结晶	(离子交换) ^d 、结晶、重结晶	见文本内容

注:a表示L-氨基酸连接酶催化路线所需原料;b表示对于化学合成企业,酶的制备步骤可以外包,或可采购所需酶制剂;c表示AET催化路线所需步骤;d表示AET催化路线不一定需要该步骤

Note: a. raw materials needed for the L-amino acid ligase catalytic route; b. for chemical synthesis companies, the enzyme preparation step can be outsourced or the required enzyme preparation can be procured; c. steps needed for the AET catalytic route; d. the step is not necessarily needed for the AET catalytic route

浓度高,产品提取难度低,是一种高效的生产技术。在进一步提高固定化酶性能后,其生产工艺更适合应急的Ala-Gln快速生产。但要注意的是,目前利用生物酶生产Ala-Gln的产量和转化效率还有一定提升空间,分离提取技术还在不断优化。未来,随着对关键酶的深入研究,包括理性设计与定向进化等,以及更绿色环保的酵母表达系统的不断完善和应用,Ala-Gln的生产路线将更为广阔。

参考文献

- [1] 陈祥娥, 陈关祥, 王涛. 丙谷二肽的生物合成研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(11): 240-245.
Chen X E, Chen G X, Wang T. Progress on the bio-synthesis of L-alanyl-L-glutamine[J]. China Food Additives, 2022, 33(11): 240-245.
- [2] Coqueiro A Y, Raizel R, Bonvini A, *et al.* Effects of glutamine and alanine supplementation on muscle fatigue parameters of rats submitted to resistance training [J]. Nutrition, 2019, 65: 131-137.
- [3] 全浩龙, 梁文豪, 柯崇榕, 等. 丙谷二肽的合成研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2024, 44(6): 129-142.
Quan H L, Liang W H, Ke C R, *et al.* Advances in the synthesis of Ala-Gln [J]. China Biotechnology, 2024, 44(6): 129-142.
- [4] Andrews F J, Griffiths R D. Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill[J]. British Journal of Nutrition, 2002, 87(Suppl 1): S3-S8.
- [5] Wang J, Li Y F, Qi Y L. Effect of glutamine-enriched nutritional support on intestinal mucosal barrier function, MMP-2, MMP-9 and immune function in patients with advanced gastric cancer during perioperative chemotherapy [J]. Oncology Letters, 2017, 14 (3) : 3606-3610.
- [6] 王文渊, 梁小波, 王文达. 大肠癌术后应用丙氨酰-谷氨酰胺的临床观察[J]. 临床医药实践, 2005, 14(2): 118-119.
Wang W Y, Liang X B, Wang W D. Clinical observation of alanyl-glutamine after operation for colorectal cancer[J]. Proceeding of Clinical Medicine, 2005, (2): 118-119.
- [7] 任雪玲, 汤宁, 白丽, 等. 丙谷二肽对 γ 射线致小鼠肺组织损伤的防护作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2014, 49(4): 487-490.
Ren X L, Tang N, Bai L, *et al.* Protection of L-alanyl-L-glutamine on radiation-injured mouse lung tissue[J]. Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences), 2014, 49(4): 487-490.
- [8] 金梦怡. N-(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺在前房灌注过程中对角膜内皮的保护作用[D]. 厦门: 厦门大学, 2021.
Jin M Y. Protective effects on corneal endothelium during intracameral irrigation using N-(2)-L-alanyl-L-glutamine[D]. Xiamen: Xiamen University, 2021.
- [9] 陈渠发, 张锡迎, 张宝庭, 等. 丙氨酰谷氨酰胺对重度急性胰腺炎患者血浆内毒素、C反应蛋白水平及肠黏膜屏障功能的影响[J]. 广东医科大学学报, 2017, 35 (2): 166-169.
Chen Q F, Zhang X Y, Zhang B T, *et al.* Influence of alanyl-glutamine on the plasma endotoxin, C-reactive protein level and intestinal mucosal barrier function of the patients with severe acute pancreatitis[J]. Journal of Guangdong Medical University, 2017, 35 (2) : 166-169.

- [10] Wang W X, Qiao L N, He J, *et al.* Water microdroplets allow spontaneously abiotic production of peptides [J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2021, 12(24): 5774-5780.
- [11] 范晓光, 陈宁, 谢希贤, 等. 一种丙谷二肽的制备方法: CN106834394B[P]. 2020-11-06.
Fan X G, Chen N, Xie X X, *et al.* Preparation method of propyl glutamine dipeptide: CN106834394B [P]. 2020-11-06.
- [12] 王维法, 季圆清, 洪翔, 等. L-氨基酸连接酶偶联乙酸激酶催化合成丙谷二肽[J]. *发酵科技通讯*, 2020, 49(4): 224-229.
Wang W F, Ji Y Q, Hong X, *et al.* Enzymatic production of L-alanyl-L-glutamine by L-amino acid ligase coupled with acetate kinase [J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2020, 49(4): 224-229.
- [13] 黄欣. 氨基酸连接酶偶联聚磷酸激酶表达系统催化生成功能性二肽[D]. 大连: 大连理工大学, 2022.
Huang X. Synthesis of functional dipeptides catalyzed by amino acid ligase coupled polyphosphate kinase expression system [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2022.
- [14] Toshinobu A, Kuniki K. Method of producing peptide: JP2011239707[P]. 2010-05-17.
- [15] 洪翔, 朱新雅, 贾子樊, 等. 利用重组枯草芽胞杆菌L-氨基酸连接酶合成丙谷二肽[J]. *发酵科技通讯*, 2017, 46(2): 83-87.
Hong X, Zhu X Y, Jia Z F, *et al.* Enzymatic synthesis of L-alanyl-L-glutamine by L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis* [J] *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2017, 46(2): 83-87.
- [16] 桥本信一, 田畑和彦, 羽田文, 等. 生产二肽的方法: CN1720325[P]. 2006-01-11.
Hashimoto S, Tabata K, Haneda F, *et al.* Methods of producing dipeptides: CN1720325[P]. 2006-01-11.
- [17] 朱江明. 高效合成丙谷二肽重组大肠杆菌的构建[D]. 福州: 福建师范大学, 2019.
Zhu J M. Construction of recombinant *Escherichia coli* with high efficiency for L-alanyl-L-glutamine synthesis [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2019.
- [18] Tabata K, Hashimoto S-I. Fermentative production of L-alanyl-L-glutamine by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain expressing L-amino acid alpha-ligase [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6378-6385.
- [19] 刘平祥, 陈嫦青, 刘金萍, 等. 一种制备L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的方法: CN109486883A[P]. 2019-03-19.
Liu P X, Chen C Q, Liu J P, *et al.* A method for preparing L-alanyl-L-glutamine: CN109486883A [P]. 2019-03-19.
- [20] Yokozeki K, Hara S. A novel and efficient enzymatic method for the production of peptides from unprotected starting materials [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115(2): 211-220.
- [21] Abe I, Hara S, Yokozeki K. Gene cloning and characterization of α -amino acid ester acyl transferase in *Empedobacter brevis* ATCC14234 and *Sphingobacterium siyangensis* AJ2458 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(11): 2087-2092.
- [22] Hirao Y, Mihara Y, Kira I, *et al.* Enzymatic production of L-alanyl-L-glutamine by recombinant *E. coli* expressing α -amino acid ester acyltransferase from *Sphingobacterium siyangensis* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(3): 618-623.
- [23] 何艳春, 刘沛沛, 张震宇, 等. 产丙谷二肽重组大肠杆菌的构建及发酵优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(3): 287-295.
He Y C, Liu P P, Zhang Z Y, *et al.* Construction of a L-alanyl-L-glutamine producing recombinant strain and optimization of its fermentation conditions [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2017, 36(3): 287-295.
- [24] 刘沛沛, 张震宇, 孙付保, 等. 酶法产L-丙氨酰-L-谷氨酰胺重组大肠杆菌 *pepD/pepN* 基因的敲除及其发酵优化[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(6): 7-14.
Liu P P, Zhang Z Y, Sun F B, *et al.* The knockout of genes *pepD* and *pepN* of recombinant *Escherichia coli* producing L-alanyl-L-glutamine and optimization of its fermentation conditions [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(6): 7-14.
- [25] Jing Z Y, Xu J, Liu J, *et al.* Multiplex gene knock-out raises Ala-Gln production by *Escherichia coli* expressing amino acid ester acyltransferase [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(11): 3523-3533.
- [26] 傅荣昭, 李振伟, 张贵慰. 丙谷二肽的制备方法、丙谷二肽制备用酶及应用: CN110382705B[P]. 2022-07-15.
Fu R Z, Li Z W, Zhang G W. Preparation method, enzyme for preparation and application of propyl glutamine dipeptide: CN110382705B[P]. 2022-07-15.
- [27] 裴绪泽. α -酯酰基转移酶重组大肠杆菌生产丙谷二肽[D]. 大连: 大连理工大学, 2020.
Pei X Z. L-alanyl-L-glutamine production by recombinant *Escherichia coli* expressing α -amino acid ester acyl transferase [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2020.
- [28] 裴绪泽, 李益民, 杜聪, 等. 重组大肠杆菌的高密度培

- 养及在丙谷二肽生产中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(13): 30-35.
- Pei X Z, Li Y M, Du C, *et al.* High-cell-density cultivation of the recombinant *E. coli* and its application in the production of Ala-Gln[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(13): 30-35.
- [29] 刘鹏飞. α -氨基酸酯酰基转移酶工程菌构建、表达及其催化合成丙谷二肽的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
- Liu P F. Construction and expression of α -amino acid ester acyltransferase engineering bacteria and its catalytic synthesis of L-alanyl-L-glutamine [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2018.
- [30] Li Y M, Yuan W J, Gao J Q, *et al.* Production of L-alanyl-L-glutamine by recycling *E. coli* expressing α -amino acid ester acyltransferase[J]. Bioresource Technology, 2017, 245(Pt B): 1603-1609.
- [31] 李益民. 重组微生物全细胞催化高效合成丙谷二肽[D]. 大连: 大连理工大学, 2020.
- Li Y M. High efficient synthesis of L-alanyl-L-glutamine by whole-cell catalysis of recombinant microorganism [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2020.
- [32] Li Y M, Du C, Jing Z Y, *et al.* Clean production of L-alanyl-L-glutamine by an efficient yeast biocatalyst expressing α -amino acid ester acyltransferase without N-glycosylation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(16): 6398-6405.
- [33] Lin L C, Pi L, Sun Y, *et al.* A methanol-inducible promoter and its application in the preparation of L-alanyl-L-glutamine: WO2023184539[P]. 2023-10-05.
- [34] 邢将军, 许刘华, 任世阔, 等. 一种酶催化合成丙谷二肽的制备方法 & 工艺系统: CN104561202A [P]. 2015-04-29.
- Xing J J, Xu L H, Ren S K, *et al.* An enzyme-catalyzed preparation method and process system for the synthesis of propyl glutamine dipeptide: CN, 104561202A [P]. 2015-04-29.
- [35] 袁文杰, 李益民, 范超, 等. 重组酿酒酵母及其在合成丙谷二肽中的应用: CN106754447A [P]. 2017-05-31.
- Yuan W J, Li Y M, Fan C, *et al.* Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* and its application in the synthesis of propyl glutamine dipeptide: CN106754447A [P]. 2017-05-31.
- [36] Li Y M, Gao J Q, Pei X Z, *et al.* Production of L-alanyl-L-glutamine by immobilized *Pichia pastoris* GS115 expressing α -amino acid ester acyltransferase[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1):27.
- [37] Pei X Z, Li Y M, Du C, *et al.* Production of L-alanyl-L-glutamine by immobilized *Escherichia coli* expressing amino acid ester acyltransferase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(16): 6967-6976.
- [38] 张营康, 程婷, 赵飞扬, 等. 基于金属有机沸石咪唑骨架的固定化细胞的制备及其在丙谷二肽制备中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1131-1141.
- Zhang Y K, Cheng T, Zhao F Y, *et al.* Immobilizing engineered *Escherichia coli* cells into zeolitic imidazolate framework 8 for efficient biosynthesis of Ala-Gln [J] Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1131-1141.
- [39] 张学义, 李斌水, 米造吉, 等. 一种固定化酶制备丙氨酸谷氨酰胺的方法: CN113817790A [P]. 2021-12-21.
- Zhang X Y, Li B S, Mi Z J, *et al.* A method for the preparation of propyl glutamine dipeptide by immobilized enzyme: CN113817790A [P]. 2021-12-21.
- [40] 焉世杰, 邢小飞, 罗明阳, 等. 一种酶催化合成丙谷二肽的方法: CN115960983A [P]. 2023-04-14.
- Yan S J, Xing X F, Luo M Y, *et al.* An enzyme-catalyzed synthesis of propyl glutamine dipeptide: CN115960983A [P]. 2023-04-14.
- [41] Yokozeki K, Suzuki S, Hara S, *et al.* Novel peptide-forming enzyme, microbe producing the enzyme and method for producing peptide using them: US2005032187 [P]. 2005-02-10.
- [42] 于清新. 丙谷二肽的酶促合成研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- Yu Q X. Enzymatic synthesis of alanyl-glutamine [D]. Tianjin: Tianjin University, 2010.
- [43] Cao S L, Xu H, Li X H, *et al.* Papain@Magnetic nanocrystalline cellulose nanobiocatalyst: a highly efficient biocatalyst for dipeptide biosynthesis in deep eutectic solvents [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2015, 3(7): 1589-1599.
- [44] 李蓉蓉, 马文浩, 肖莹. 靛蓝生物合成酶的研究进展[J]. 生物资源, 2023, 45(4): 328-340.
- Li R R, Ma W H, Xiao Y. Research advances in enzymes involved in indigo biosynthesis [J]. Biotic Resources, 2023, 45(4): 328-340.
- [45] Tabata K, Ikeda H, Hashimoto S I. ywfE in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(15): 5195-5202.
- [46] Shomura Y, Hinokuchi E, Ikeda H, *et al.* Structural and enzymatic characterization of BacD, an L-amino acid dipeptide ligase from *Bacillus subtilis* [J]. Protein Science, 2012, 21(5): 707-716.
- [47] Kino K, Nakazawa Y, Yagasaki M. Dipeptide synthesis by L-amino acid ligase from *Ralstonia solanacearum*

- [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 371(3): 536-540.
- [48] Bordewick S, Berger R G, Ersoy F. Mutagenesis of the L-amino acid ligase RizA increased the production of bioactive dipeptides [J]. *Catalysts*, 2021, 11(11): 1385.
- [49] Arai T, Arimura Y, Ishikura S, *et al.* L-amino acid ligase from *Pseudomonas syringae* producing tabtoxin can be used for enzymatic synthesis of various functional peptides [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 5023-5029.
- [50] Liu X H, Ning L X, Zhang Y F, *et al.* Rational engineering of BaLal₁₆ from a novel *Bacillus amyloliquefaciens* strain to improve catalytic performance [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 146: 109781.
- [51] Arai T, Kino K. A novel L-amino acid ligase is encoded by a gene in the phaseolotoxin biosynthetic gene cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(11): 3048-3050.
- [52] Kino K, Noguchi A, Arai T, *et al.* Identification and characterization of a novel L-amino acid ligase from *Photobacterium luminescens* subsp. *laumondii* TT01 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110(1): 39-41.
- [53] Kino H, Kino K. Alteration of the substrate specificity of l-amino acid ligase and selective synthesis of Met-Gly as a salt taste enhancer [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(11): 1827-1832.
- [54] 王涛, 刘晓环, 宁丽笑, 等. 一种L-氨基酸连接酶突变体、重组载体、重组菌及其应用: CN112175916A [P]. 2021-01-05.
Wang T, Liu X H, Ning X L, *et al.* A type of L-amino acid ligase mutant, recombinant vector, recombinant bacterium and its application: CN112175916A [P]. 2021-01-05
- [55] Sanz Y, Lanfermeijer F C, Renault P, *et al.* Genetic and functional characterization of *dpp* genes encoding a dipeptide transport system in *Lactococcus lactis* [J]. *Archives of Microbiology*, 2001, 175(5): 334-343.
- [56] 范玉娜, 魏金澳, 杨静文, 等. 丙谷二肽合成酶的改造及性质研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2024, 35(4): 140-146.
Fan Y N, Wei J A, Yang J W, *et al.* Modification and properties of Ala-Gln synthase [J]. *China Food Additives*, 2024, 35(4): 140-146.
- [57] Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, *et al.* A comprehensive review of signal peptides: structure, roles, and applications [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2018, 97(6): 422-441.
- [58] 王寅竹, 孙涛, 吴昊, 等. 重组蛋白融合信号肽在大肠杆菌周质空间表达的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49(2): 794-806.
Wang Y Z, Sun T, Wu H, *et al.* Advances in expression of recombinant protein fusion signal peptide in *Escherichia coli* [J]. *Microbiology China*, 2022, 49(2): 794-806.
- [59] Selas Castineiras T, Williams S G, Hitchcock A, *et al.* Development of a generic β -lactamase screening system for improved signal peptides for periplasmic targeting of recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 6986.
- [60] 上官丁从, 范玉娜, 郭冯喆, 等. 响应面法优化重组大肠杆菌全细胞催化合成丙谷二肽 [J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(9): 58-65.
Shangguan D C, Fan Y N, Guo F Z, *et al.* Optimization of whole cell catalytic synthesis of Ala-Gln via recombinant *E. coli* by response surface methodology [J]. *China Food Additives*, 2021, 32(9): 58-65.
- [61] 王涛, 刘晓环, 刘血丹, 等. 一种以类沸石咪唑酯骨架材料为载体的固定化全细胞制备丙谷二肽的方法: CN115896057A [P]. 2023-04-04.
Wang T, Liu X H, Liu X D, *et al.* A method of immobilized whole cells for the preparation of propyl glutamine dipeptide using zeolite-like imidazolium ester skeletal material as a carrier: CN115896057A [P]. 2023-04-04.
- [62] 于东海, 胡俊峰, 杨彦军, 等. 一种L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的制备方法: CN102731613A [P]. 2012-10-17.
Yu D H, Hu J F, Yang Y J, *et al.* A preparation method of L-alanyl-L-glutamine: CN102731613A [P]. 2012-10-17.
- [63] 洪皓, 范超, 刘军, 等. 高纯度丙谷二肽的生产方法: CN110372773A [P]. 2019-10-25.
Hong H, Fan C, Liu J, *et al.* Production method of high purity propyl glutamine dipeptide: CN110372773A [P]. 2019-10-25.
- [64] 李斌, 刘发光, 祝俊, 等. 一种丙谷二肽的制备方法: CN111019987A [P]. 2020-04-17.
Li B, Liu F G, Zhu J, *et al.* A method for the preparation of propyl glutamine dipeptide: CN, 111019987A: CN111019987A [P]. 2020-04-17.

□

(编辑:肖展春 高华)