

多酶催化拆分 DL -正缬氨酸生产 L -正缬氨酸*

戚云龙 杨套伟** 周俊平 郑俊贤 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 -正缬氨酸是合成抗高血压药物培哚普利的重要中间体, 其合成主要通过化学方法, 具有产品纯度低、环境污染等缺点. 提出一种基于多酶介导拆分 DL -正缬氨酸结合不对称还原生产高纯度 L -正缬氨酸的方法. 首先, 将混合型 DL -正缬氨酸中的 D 型经过 D -氨基酸氧化酶氧化成相应酮酸, 然后利用亮氨酸脱氢酶将酮酸不对称还原生成 L -正缬氨酸, 同时 $NADH$ 被氧化成 NAD^+ , 最后利用甲酸脱氢酶构建 $NADH$ 循环再生系统. D -正缬氨酸被氧化过程中会产生副产物过氧化氢(H_2O_2), 通过外源添加过氧化氢酶消除该副产物. 基于前期最适转化温度、最适转化 pH 优化基础上, 对过氧化氢酶添加量和单次底物添加量进行优化, 利用分批补料策略提高 L -正缬氨酸产量. 结果显示, 在最适条件下, L -正缬氨酸产量达到61.09 g/L对映体过量值(e.e.)和转化率分别为99%和96.1%. 本研究合成 L -正缬氨酸较之化学方法, 具有环境污染少、产品纯度高等特点, 为制药行业中光学纯 L -正缬氨酸的生产提供了一种有效的方法. (图7 表3 参24)

关键词 酶促拆分; D -氨基酸氧化酶; 亮氨酸脱氢酶; $NADH$ 循环再生系统; 甲酸脱氢酶; L -正缬氨酸

CLC Q936 : Q814

Multi-enzymatic resolution of DL -norvaline for L -norvaline production*

QI Yunlong, YANG Taowei**, ZHOU Junping, ZHENG Junxian, XU Meijuan, ZHANG Xian & RAO Zhiming**

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

Abstract Perindopril is an effective and widely used antihypertensive drug. L -Norvaline is an important intermediate in the synthesis of perindopril, which is mainly produced using chemical synthesis, with low enantiomeric purity and adverse environmental impacts. This paper presents an environmental friendly method for producing high-purity L -norvaline based on a multi-enzymatic resolution process combined with asymmetric reduction. D -Norvaline was oxidized from the substrate DL -norvaline to the corresponding keto acid using D -amino acid oxidase (DAAO). Next, leucine dehydrogenase (LeuDH) was used to catalyze the asymmetric reduction of keto acid to L -norvaline, with concomitant oxidation of $NADH$ to NAD^+ . Finally, formate dehydrogenase (FDH) was used to introduce an additional $NADH$ regeneration system. The unwanted by-product hydrogen peroxide generated during D -norvaline oxidation could be removed by addition of catalase. Based on the previous optimization of conversion temperature and pH , the amount of catalase added and the proportions of DAAO, LeuDH, and FDH were optimized, and a fed-batch strategy was used to obtain a high yield of L -norvaline. Under optimal conditions, 61.09 g/L of L -norvaline was achieved, with an enantiomeric excess of $> 99\%$ and a conversion rate of 96.1%. In comparison with chemical synthesis, the newly developed method offers the advantages of environmental protection and high product purity; hence, it represents an efficient strategy for pharmaceutical production of enantiomerically pure L -norvaline.

Keywords enzymatic resolution; D -amino acid oxidase; leucine dehydrogenase; $NADH$ regeneration; formate dehydrogenase; L -norvaline

收稿日期 Received: 2017-01-23 接受日期 Accepted: 2017-03-13

*国家高技术研究发展计划(863计划)(2015AA021004)、江苏省杰出青年基金项目(BK20150002)、江苏省自然科学基金项目(BK20161292)、国家自然科学基金项目(31570085)和中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP51708A)资助 Supported by the High-tech Research and Development Program of China (2015AA021004), the Science Fund for Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province, China (BK20150002), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20161292), the National Natural Science Foundation of China (31570085), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (JUSRP51708A)

**通讯作者 Corresponding author(E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn; ytw1228@163.com)

高血压是一种很常见的慢性心血管疾病，全球每年有近700万患者因高血压及相关心血管疾病而导致死亡^[1]。培垛普利是一种常见的较为有效的降压药，市场需求量较大。L-正缬氨酸是合成培垛普利的关键中间体，目前主要通过化学合成获得L-正缬氨酸，该方法具有价格昂贵操作过程复杂、产品纯度低（e.e.% < 75%）及环境污染等缺点^[2-3]；国内关于生物合成L-正缬氨酸的报道较少，国外的Stoynova教授团队通过发酵敲除乙酰醇酸合酶基因的肠杆菌生产L-正缬氨酸^[4]；Soriano教授等人通过L-N-氨甲酰水解酶和N-琥珀酰氨基酸消旋酶共同催化外消旋N-甲酰-正缬氨酸和N-氨基甲酰正缬氨酸生成L-正缬氨酸^[5]；Jong-Shik Shin教授等人以酮酸为底物，以丙氨酸为氨基供体，利用 ω -转氨酶不对称合成L-正缬氨酸^[6]；Chiriac教授团队通过利用亮氨酸脱氢酶为催化剂，以葡萄糖脱氢酶及半乳糖变旋构酶构建NADH再生系统进行酶法合成L-正缬氨酸^[7]。

由于酶催化剂具有高效性、高立体选择性和高对映选择性等特点，因此通过酶介导的手性拆分技术生产单一对映体物质具有非常广泛的应用前景^[8]。D-氨基酸氧化酶（DAAO，EC 1.4.3.3）是一种以黄素腺嘌呤（FAD）为辅基的典型黄素蛋白酶类，可将D-氨基酸氧化成相应的酮酸和氨，同时生成H₂O₂^[9]。DAAO对底物具有高度立体选择性和广谱性，因此被广泛应用于D-氨基酸的定性定量分析、生物传感器等领域^[10]。DAAO也被广泛应用于手性拆分技术生产单一对映体物质^[11-12]。亮氨酸脱氢酶（LeuDH，EC 1.4.1.9）是一种NADH依赖型氧化还原酶，能够将多种酮酸还原氨化生成相应的L-氨基酸，被广泛应用于L-亮氨酸和其他支链L-氨基酸的生产^[13]。NADH是LeuDH催化过程中重要的辅酶，由于NADH价格昂贵，工业生产过程中外源添加NADH成本太高，因此研究者们尝试通过各种策略来实现NADH循环再生，例如酶催化法、电化学法、化学法和光化学法等策略^[14]。甲酸脱氢酶（FDH，EC 1.2.1.2）是辅酶酶法再生领域的热点之一，其能够将甲酸氧化为二氧化碳同时将NAD⁺还原为NADH，由于其具有反应过程不可逆、甲酸价格低廉、反应产物二氧化碳很容易

易从反应体系中除去等优点，被广泛应用于NADH循环再生系统的构建^[15]。刘维明等人通过在大肠杆菌中表达亮氨酸脱氢酶，利用甲酸脱氢酶实现NADH循环再生，全细胞转化生产L-叔亮氨酸，具有良好的工业化应用前景^[16]。

基于上述3种酶的催化特性，本文提出了一种有效的高纯度L-正缬氨酸的合成方法，即将混合型DL-正缬氨酸中的D型通过酶介导的拆分结合不对称还原转化成L型，此外通过外源添加过氧化氢酶去除D-正缬氨酸被DAAO氧化过程中产生的副产物H₂O₂，旨在为制药行业中手性纯L-正缬氨酸的生产提供一种有效的策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 本实验所用菌株及质粒见表1。

1.1.2 主要试剂与仪器 DL-正缬氨酸（纯度>98.5%，D型和L型比例为1:1）从河南科邦生物科技股份有限公司购得；限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、E × Taq DNA 聚合酶均购自TaKaRa 公司（大连），染色体快速提取试剂盒、质粒快速提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、异丙基-β-D-硫代半乳糖（IPTG）、氨苄青霉素（Amp）、卡那霉素（Kan）等均购自生工(上海)生物工程有限公司；PCR 引物由生工(上海)生物工程有限公司合成，其他常用试剂均为国产分析纯。PCR 仪、蛋白电泳仪购自BioRad公司，核酸电泳仪购自北京六一仪器厂，UVP凝胶成像仪购自英国UVP有限公司，离心机购自Sigma公司。

1.1.3 培养基 大肠杆菌*Escherichia coli* BL21(DE3)和钝齿棒杆菌*Corynebacterium crenatum* SYPA5-5均采用TB培养基培养（甘油5 g/L，酵母提取物24 g/L，胰蛋白胨12 g/L，2.31 g/L KH₂PO₄和12.54 g/L K₂HPO₄）。

1.2 方法

1.2.1 DAAO酶基因*daao*、LeuDH酶基因*leudh*及FDH酶基因*fdh*的PCR扩增 根据NCBI中公布的来源于圆红冬孢酵母

表1 本研究所用菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strain/plasmid	特性 Characteristic	来源 Source
菌株 Strain		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-mK-)supE44	英杰公司 Invitrogen
JM109/ pTXMJ19- <i>daao</i>	JM109 harboring pTXMJ19- <i>daao</i> (Cm ^R)	本研究构建 This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal λ(DE3)	英杰公司 Invitrogen
BL21/pET-28a (+)	BL21 harboring pET-28a (+) (Km ^R)	本研究构建 This study
BL21/pET-28a (+)- <i>fdh</i>	BL21 harboring pET-28a (+)- <i>fdh</i> (Km ^R)	本研究构建 This study
BL21/pET-28a (+)- <i>leudh</i>	BL21 harboringpET-28a (+)- <i>leudh</i> (Km ^R)	本研究构建 This study
<i>Corynebacterium crenatum</i> SYPA5-5	arginine producer	实验室储存 Lab stock
SYPA5-5/ pTXMJ19- <i>daao</i>	<i>C. crenatum</i> SYPA5-5 harboringpTXMJ19- <i>daao</i>	本研究构建 This study
质粒 Plasmid		
pET-28a (+)	Expression plasmid, Km ^R , T7 promoter	实验室储存 Lab stock
pET-28a (+)- <i>fdh</i>	pET-28a (+) with <i>fdh</i> -His	本研究构建 This study
pET-28a (+)- <i>leudh</i>	pET-28a (+)with <i>leudh</i> -His	本研究构建 This study
pXMJ19	Expression plasmid, Cm ^R , Tac promoter	实验室储存 Lab stock
pTXMJ19	pXMJ19 with Tac mutant	实验室储存 Lab stock
pTXMJ19- <i>daao</i>	pTXMJ19 harboring <i>daao</i> -His	本研究构建 This study

Amp^R: 氨苄青霉素抗性; Km^R: 卡那霉素抗性; Cm^R: 氯霉素抗性。
Amp^R: Ampicillin-resistant; Km^R: Kanamycin-resistant; Cm^R: Chloromycetin-resistant.

表2 本研究所用引物
Table 2 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	限制性酶切位点 Restriction site
P1	GGGGTACCAAGGAGGGAAATCATGGGATCCAAAAGAGGGTT	<i>Kpn</i> I
P2	CGGAATTCCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGCTTAGACTCGCGGCG	<i>Eco</i> RI
P3	ACCGGGATCCATGACATTAGAAATCTTCG	<i>Bam</i> HI
P4	CGCGTCGACTTAGCGACGGCTAATAATATC	<i>Sal</i> I
P5	ACCGGGATCCATGAAGATCGTTTATAGTC	<i>Bam</i> HI
P6	CGCGTCGACTTATTTCTTATCGTGTTC	<i>Sal</i> I

酶切位点用下划线标注, 组氨酸标签编码区用粗体标注。

The restriction enzyme sites were underlined, and the His-Tag coding region was bold typed.

Rhodospiridium toruloides 的DAAO基因*daao*、蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 的LeuDH基因*leudh*及博伊丁假丝酵母 *Candida boidinii* 的FDH基因*fdh*序列设计引物(表2), 以总DNA为模板, 对*daao*、*leudh*和*fdh*进行PCR扩增, PCR扩增产物纯化参照PCR产物纯化试剂盒标准方法。

1.2.2 大肠杆菌表达载体及钝齿棒杆菌表达载体的构建

将经纯化的基因*daao*、*leudh*及*fdh*分别连到pMD18-T克隆载体上, 转化 *E. coli* JM109, 挑取阳性克隆, 将筛选得到的pMD18-T-*daao*、pMD18-T-*leudh*和pMD18-T-*fdh*进行测序鉴定。质粒pMD18-T-*daao*和本研究室前期构建的高效表达质粒pTXMJ19(用经过优化的Tac启动子替换pXJM19上原有的Tac启动子, 能在 *C. crenatum* 等阳性菌中高效表达^[17])经 *Kpn*I / *Eco*R I 双酶切, 胶回收纯化, 16 ℃过夜连接, 将连接物热击转化 *E. coli* JM109感受态细胞, 用氯霉素抗性平板筛选阳性转化子, 提取转化子质粒, 经 *Kpn*I / *Eco*R I 双酶切后释放出大小约为6.6 kb和1071 bp的基因片段, 证明重组质粒构建成功, 命名为pTXMJ19-*daao*, 并通过电击转化法转化至 *C. crenatum* SYPA 5-5中; 挑取阳性转化子后提取质粒进行PCR验证。

质粒pMD18-T-*leudh*、pMD18-T-*fdh*和载体pET-28a (+)经 *Bam*HI / *Sal*I 双酶切, 胶回收纯化, 16 ℃过夜连接后热击转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 通过PCR验证, 最终获得重组质粒pET-28a (+)-*leudh*和pET-28a (+)-*fdh*。

1.2.3 DAAO、LeuDH和FDH的表达纯化及SDS-PAGE分析

将重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pTXMJ19-*daao*、*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*leudh*和 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*fdh*按照1%接种量分别转接于100 mL TB培养基中后, 将 *C. crenatum* SYPA 5-5/pTXMJ19-*daao*置于30 ℃, 180 r/min培养, 将 *E. coli* BL21(DE3) /pET-28a(+)-*leudh*和 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*fdh*置于37 ℃、180 r/min培养, 直至OD₆₀₀值在0.6-0.8之间, 分别加入终浓度为0.8 mmol/L的IPTG后, 将 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*leudh*和 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*fdh*置于28 ℃, 180 r/min培养10 h, 将 *C. crenatum* SYPA 5-5/pTXMJ19-*daao*置于30 ℃、180 r/min培养10 h后, 10 000 r/min离心除去发酵液, 用0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液清洗细胞两次后, 用10 mL缓冲液重新悬浮菌体。用超声破碎机对菌体进行破碎处理(破3 s停7 s共100个循环)后, 4 ℃条件下10 000 r/min离心15 min, 获得破碎上清粗酶液, 依据GE Healthcare Bio-Sciences程序用Ni-NTA亲和层析柱通过梯度洗脱纯化出DAAO、LeuDH和FDH, 取适量破碎上清和纯化样品加入等体积2×蛋白电泳缓冲液沸水浴处理15 min、12 000 r/min离心10 min后取10 μL样品进行12% SDS-PAGE电

泳。

1.2.4 DAAO、LeuDH和FDH酶活测定 DAAO酶活测定根据Molla等人的方法^[18], LeuDH和FDH酶活测定参考刘维明等人的检测方法^[19]。

1.2.5 DAAO酶学性质分析 (1) DAAO最适反应温度和最适反应pH: 将纯化的DAAO酶液分别置于以下不同pH的缓冲液中, 0.1 mol/L乙酸-乙酸钠 (pH 4.5-5.5), Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 5.5-8.5), Na₂B₄O₇-NaOH (pH 8.5-10.5), 按照1.2.4所述方法测定DAAO酶活。将纯化的DAAO酶置于15-60 ℃, 分别在最适反应pH条件下测定DAAO酶活。

(2) DAAO的热稳定性和pH稳定性测定: 将纯化后的DAAO分别置于-20 ℃、0 ℃、25 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃中放置一段时间, 在相应时间内取样, 在最适反应温度和最适pH条件下测定DAAO的酶活。将纯化后的DAAO置于不同pH的缓冲液中, 并将其在0 ℃下保存, 在相应时间内取样, 测定DAAO酶活。

(3) DAAO的动力学特征及金属离子对DAAO酶活的影响: 依据DAAO的酶促反应, 分别配置不同浓度的D-正缬氨酸, 加入过量DAAO, 分别测定DAAO酶活, DAAO的米氏常数和最大反应速率值通过Lineweaver作图法计算。DAAO在0.1 mol/L的Tris-HCl中经过透析去除本身所带的离子, 分别在反应体系中添加终浓度为1.0 mmol/L的金属离子 (Na⁺, K⁺, Ni²⁺, La³⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Mn²⁺, EDTA, Ba²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺) 和EDTA, 在最适温度和最适pH下测定添加不同离子情况下的DAAO酶活。

1.2.6 转化体系的构建及条件优化 将获得的DAAO、LeuDH和FDH的粗酶液按照2:1:0.5添加比例加入到50 mL规模的转化体系中[0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液, pH 7.5, 包含10 g/L甲胺铵, 5% (V/V) 甘油, 30 U/mL过氧化氢酶和5 g/L DL-正缬氨酸底物], 每毫升转化体系所含酶活分别为3.6 U/mL、1.8 U/mL和0.9 U/mL, 将转化体系置于磁力搅拌器上, 控制转速为160 r/min, 控制温度和pH分别为30 ℃和7.5 (用20%甲酸和50%氨水调节pH)。

过氧化氢酶添加量优化: 将转化体系置于磁力搅拌器上, 控制转速为160 r/min, 控制温度和pH分别为30 ℃和7.5, 添加不同量的过氧化氢酶, 使单位转化体系的过氧化氢酶酶活分别为0、21.29、42.59、85.18、106.47 U/mL, 转化1 h后取样, 用HPLC法测定不同过氧化氢酶酶活下的转化速率。

底物DL-正缬氨酸添加量优化: 分别测定单批次底物DL-正缬氨酸投量为1、3、5、7、9 g/L时的L-正缬氨酸产量。

1.2.7 分批补料策略生产L-正缬氨酸 通过高压匀浆机破

碎菌体获得DAAO、LeuDH和FDH粗酶液，按照前期酶配比优化结果，将DAAO、LeuDH和FDH粗酶液以2:1:0.5比例添加到5 L规模转化体系中[0.1 mol/L Tris-Hcl缓冲液，pH 7.5，包含10 g/L甲酸铵，5% (V/V) 甘油，43 U/mL过氧化氢酶和5 g/L DL-正缬氨酸底物]，当D-正缬氨酸被全部转化为L-正缬氨酸时，再往转化体系中添加底物DL-正缬氨酸，控制转化温度，pH和转速分别为30 ℃、7.5 和 160 r/min.

1.2.8 D-正缬氨酸和L-正缬氨酸检测分析 D-正缬氨酸及L-正缬氨酸通过HPLC法测定浓度，具体操作参考Denton等人的方法^[18]进行测定，转化率(*r*)按照以下公式进行计算：

$$r = \frac{\rho_{L\text{-norvaline}} - \rho_{0L\text{-norvaline}}}{\rho_{D\text{-norvaline}}} \times 100\%$$

$\rho_{L\text{-norvaline}}$ 表示由D-正缬氨酸转化生成的L-正缬氨酸的浓度； $\rho_{0L\text{-norvaline}}$ 表示混合型底物DL-正缬氨酸中初始含有的L-正缬氨酸的浓度； $\rho_{D\text{-norvaline}}$ 表示混合型底物DL-正缬氨酸中初始含有的D-正缬氨酸的浓度。

2 结果与分析

2.1 相关基因的表达及酶活

2.1.1 DAAO酶基因*daao*、LeuDH酶基因*leudh*及FDH酶基因*fdh*的克隆与分析 由于前期构建的pET-28a (+)-*daao*在*E. coli* BL21(DE3)中表达时以包涵体形式存在，因此，尝试在本研究前期诱变的精氨酸高产菌株*C. crenatum* SYPA 5-5中进行表达(该菌种为安全菌株且发酵菌体量大，前期研究室已经用于表达不同外源蛋白^[20-21])。DNA序列比对显示*daao*的编码区有1 071 bp。分别以蜡样芽孢杆菌*Bacillus cereus*和博依丁假丝酵母*Candida boidinii*的基因组为模板，依据1.2.1所述方法获得重组质粒pET-28a(+)-*leudh*和pET-28a(+)-*fdh*。序列比对显示*leudh*含有1101 bp，并且与NCBI中已报道的不同来源的*leudh*具有高度相似性，与来源于韦氏芽孢杆菌(*Bacillus weihenstephanensis* strain WSBC 10204)、弗格森氏大肠埃希菌(*Escherichia fergusonii* ATCC 35469)的*leudh*的相似性均为99%，与来源于阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii* strain ATCC 29544)的相似性为91%。通过序列比对显示*fdh*基因的开放阅读框包含1 095 bp，编码364个氨基酸。

2.1.2 *daao*、*leudh*和 *fdh*的表达与SDS-PAGE分析 将经过诱导表达的重组菌与对应的原始菌进行超声破碎，取破碎上清进行SDS-PAGE分析，检测到重组菌*C. crenatum* SYPA 5-5/pTXMJ19-*daao*、*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a (+)-*leudh*和*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-*fdh*分别存在分子量(*M_r*)约为39.0 × 10³、40.0 × 10³和40.3 × 10³的特异性条带(图1)，并测定重组菌与对应原始菌的酶活，结果如表3所示，发现重组菌的DAAO酶活为1.04 U/mL，与用原始pXMJ19为表达载体时相比，酶活提高了近20%，原始菌中未检测到DAAO酶活；重组菌的LeuDH酶活为33.32 U/mL，比原始菌的LeuDH酶活提高了52倍；重组菌的FDH酶活为0.48 U/mL，原始菌中未检测到FDH酶活。

2.2 酶学性质分析、转化条件优化及分批补料策略

2.2.1 DAAO酶学性质 由于前期构建的pET-28a (+)-*daao*在*E. coli* BL21(DE3)中表达时以包涵体的形式存在，因此选择将*daao*在*C. crenatum* SYPA 5-5中进行表达，并对其酶学性

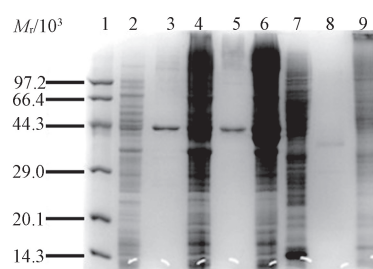


图1 原始菌与重组菌蛋白的SDS-PAGE分析。
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of proteins in parent bacteria and recombinant bacteria. 1: Protein marker; 2: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3); 3: Purified supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*fdh*; 4: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*fdh*; 5: purified supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*leudh*; 6: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-*leudh*; 7: Supernatant of *C. crenatum* SYPA 5-5/pTXMJ19-*daao*; 8: Purified supernatant of *C. crenatum* SYPA 5-5; 9: Supernatant of *C. crenatum* SYPA 5-5.

表3 DAAO、LeuDH和FDH在不同菌株中的酶活
Table 3 Activity of DAAO, LeuDH and FDH in various strains

菌株 Strain	酶 Enzyme	酶活 Enzyme activity (μ U mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> BL21	LeuDH	0.64 ± 0.03
BL21/pET-28a (+)- <i>leudh</i>	LeuDH	33.32 ± 0.12
<i>E. coli</i> BL21	FDH	0
BL21/pET-28a (+)- <i>fdh</i>	FDH	0.48 ± 0.02
<i>Corynebacterium crenatum</i> SYPA5-5	DAAO	0
SYPA5-5/pXMJ19- <i>daao</i>	DAAO	0.87 ± 0.06
SYPA5-5/pTXMJ19- <i>daao</i>	DAAO	1.04 ± 0.07

质进行分析，为后期拆分条件优化提供参考。

(1) DAAO最适反应温度和最适反应pH: 如图2a所示，DAAO的相对酶活随温度上升而逐渐提高，当反应温度达到25 ℃时，相对酶活达到最大值，因此，DAAO的最适反应温度为25 ℃，这与来源于*Sus scrofa*的DAAO的最适反应温度相同^[22]。DAAO最适反应pH测定结果如图2b所示，当pH为8.0时，相对酶活达到最大，因此最适反应pH为8.0，这与来源于*Rattus norvegicus*的DAAO的最适反应pH相同^[23]。

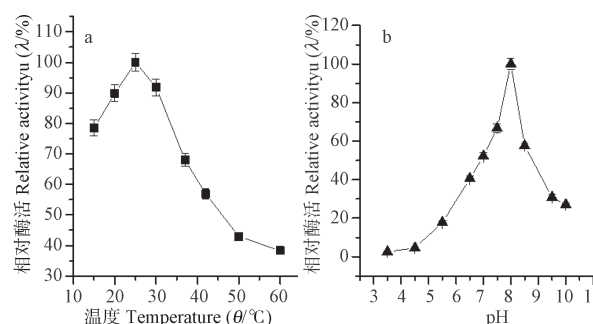


图2 DAAO最适反应温度(a)和最适反应pH(b)。
Fig. 2 The optimum temperature (a) and pH (b) of DAAO.

(2) DAAO的温度稳定性和pH稳定性: DAAO温度稳定性结果如图3a所示，在25 ℃和30 ℃下分别放置5 h后，DAAO酶活分别保留40%和30%，当温度高于40 ℃时，DAAO的稳定性剧烈下降，将在40 ℃放置于1 h，酶活即降低至35%。DAAO

的pH稳定性如图3b所示,当pH在7-10之间时,DAAO具有较高的稳定性。

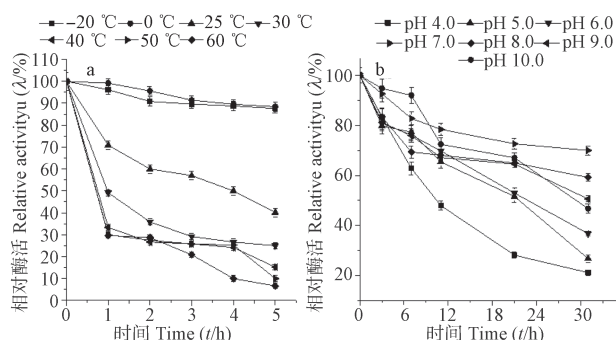


图3 DAAO温度稳定性 (a) 和pH稳定性 (b)。

Fig. 3 The thermal stability (a) and pH stability (b) of DAAO.

(3) DAAO的反应动力学常数测定和金属离子对DAAO酶活的影响:如图4a所示, Mn^{2+} 对DAAO的酶活具有较强的促进作用,EDTA、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 等对DAAO酶活具有较强的抑制作用。DAAO的最大反应速率 V_{max} 和米氏常数 K_m 通过Lineweaver Burk作图法求得,结果如图4b所示,该酶的 V_{max} 为 $48.5 \mu mol L^{-1} min^{-1}$, K_m 值为 $3.3 mmol/L$ 。

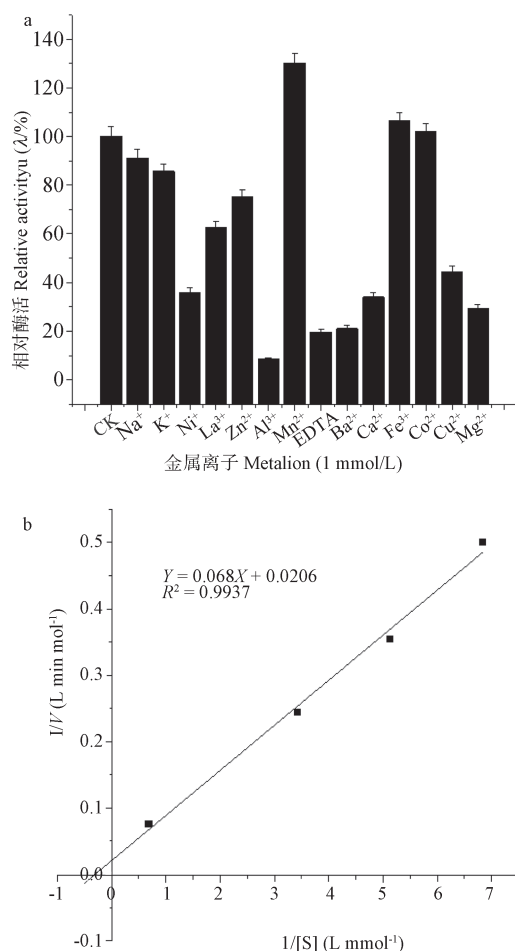


图4 金属离子对DAAO的影响 (a) 和DAAO的动力学特征 (b)。

Fig. 4 The effect of metal ion on DAAO (a) and Lineweaver Burk plots of

DAAO (b).

2.2.2 基于关键酶酶学性质优化转化条件 DAAO、LeuDH和FDH都有其各自的催化特性,为了使三者协同催化,必须对转化条件进行优化,对转化温度和转化pH进行优化,选择最适转化温度和pH分别为 $30\text{ }^{\circ}C$ 和pH 7.5 (具体数据未显示)。

D-正缬氨酸被DAAO氧化为酮酸的过程中会产生 H_2O_2 ,据文献报道, H_2O_2 会对酶催化剂产生不利影响^[24],通过在转化体系中添加过氧化氢酶去除 H_2O_2 ,其添加量优化结果如图5所示,当过氧化氢酶浓度达到 $42 U/mL$ 时转化速率达到最大,继续提高过氧化氢酶浓度,转化速率基本保持不变,因此最适过氧化氢酶浓度为 $42 U/mL$ 。

单次DL-正缬氨酸投量优化结果如图6所示,在2 h内,随着DL-正缬氨酸投量提高,L-正缬氨酸产量也逐渐提高,当底物投量为 $5 g/L$ 时,D-正缬氨酸全部被转化成L-正缬氨酸,当投量超过 $5 g/L$ 时,L-正缬氨酸产量提高不明显,因此单次底物投量为 $5 g/L$ 较为合适。

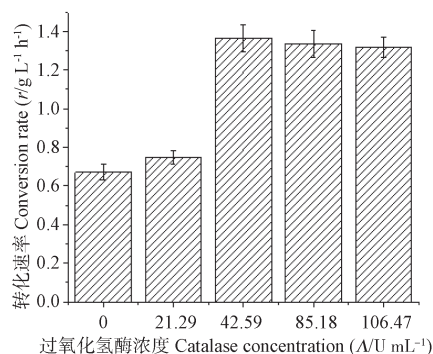


图5 不同过氧化氢酶添加量对转化速率的影响。

Fig. 5 Effects of different catalase addition on the conversion rate.

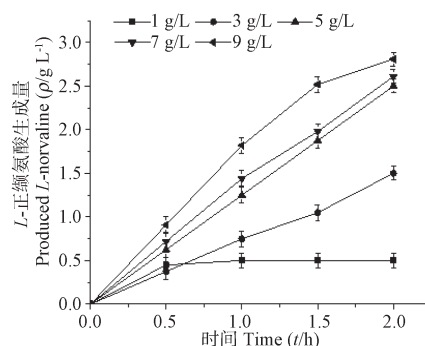


图6 不同底物浓度对L-正缬氨酸产量的影响。

Fig. 6 Effects of different substrate concentration on the L-norvaline production.

2.2.3 分批补料策略用于L-正缬氨酸生产 采用分批补料策略可以有效提高目标产物的产量和转化速率,高浓度的DL-正缬氨酸会抑制转化过程的进行,因此可以通过采用分批补料策略来避免高浓度底物对转化过程的抑制作用,获得较高产量。初始DL-正缬氨酸底物投量为 $5 g/L$,当检测到D-正缬氨酸几乎全被转化为L-正缬氨酸时,再往转化体系中添加 $5 g/L$ DL-正缬氨酸,转化过程如图7所示,在前期补料过程中,L-正缬氨酸产量逐渐提高, $30.54 g/L$ D-正缬氨酸被转

化为L-正缬氨酸,平均转化速率为 $1.22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$,随着转化继续进行,转化速率逐渐降低,产率也逐渐下降,依据前期对关键酶稳定性分析,推测随着转化反应的进行,DAAO等酶催化剂的活性也在逐渐降低,最终检测到L-正缬氨酸浓度为 61.09 g/L ,转化率达到96.1%,产物e.e.值超过99%。

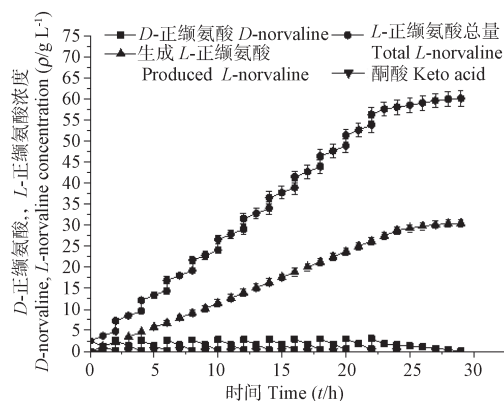


图7 分批补料策略运用于酶促拆分DL-正缬氨酸生成L-正缬氨酸的转化曲线。

Fig. 7 Conversion curve of a fed-batch enzymatic resolution of DL-norvaline for L-norvaline production.

3 讨论与结论

利用多酶介导的去对称拆分DL-正缬氨酸生产L-正缬氨酸是一种有效的L-正缬氨酸合成方法,该方法具有产物纯度高、环境污染少、转化效率高、无副产物积累等特点。关于生物法合成L-正缬氨酸的报道,主要有Stoynova教授团队通过发酵一株乙酰醇酸合酶基因被敲除的肠杆菌来生产高纯度的L-正缬氨酸,由于产量较低(0.9 g/L)无法满足工业化生产要求^[4]; Shin Jone-Shik团队通过以酮酸为底物,以异丙胺为氨基供体,利用 ω -转氨酶合成L-正缬氨酸,2 h生成 5.8 g/L L-正缬氨酸,e.e.达到99%^[6],但是异丙胺脱氨过程中会产生副产物异丙醇,增加了产品分离纯化成本;Maldonado教授团队以外消旋N-甲酰-DL-正缬氨酸为底物,采用L-N-氨甲酰水解酶和N-琥珀酰-氨基酸消旋酶共同作用生成L-正缬氨酸,3 h生成 7.5 mmol/L L-正缬氨酸,转化率超过95%,随后该团队又以外消旋N-氨基甲酰-DL-正缬氨酸为底物采用同样方法合成L-正缬氨酸,结果7 h生成 7.5 mmol/L L-正缬氨酸^[5]。与我们提出的方法相比,该方法的产物合成速率较低;还有文献报道以酮酸为底物,以亮氨酸脱氢酶和葡萄糖脱氢酶共同催化合成L-正缬氨酸^[7]。

综上,基于DAAO、LeuDH和FDH的催化特点,本研究提出了一种多酶介导拆分DL-正缬氨酸结合不对称还原生成高纯度L-正缬氨酸的方法,通过优化转化温度、转化pH和过氧化氢酶添加量,采用分批补料策略提高产量和转化速率。然而,由于所用酶催化剂都是通过胞内表达生成的,必须通过菌体裂解才能获取,较为浪费时间。因此,为了较为快捷的获取酶催化剂,后期可以采取相关策略让酶催化剂分泌到胞外。

参考文献 [References]

- Fagard RH. Resistant hypertension [J]. *Heart*, 2012, **98** (3): 254-261
- Qian C, Gong L, Chen XZ. Preparation of optical active aliphatic α -amino acid from fatty acid: synthesis of L-norvaline and D-norvaline [J]. *Res Chem Intermed*, 2009, **35** (1): 117-121
- Xie R, Chu LY, Deng JG. Membranes and membrane processes for chiral resolution [J]. *Chem Soc Rev*, 2008, **37** (6): 1243-1263
- Stoynova N, Sycheva E, Preobrazhenskaya E. Method for producing abnormal amino acids using a bacterium of the Enterobacteriaceae family having all acetohydroxy acid synthases inactivated: U.S. Patent Application 11/218, 787 [P]. 2005-09-06
- Soriano-Maldonado P, Las Heras-Vazquez FJ, Clemente-Jimenez JM, Rodriguez-Vico F, Martinez-Rodriguez S. Enzymatic dynamic kinetic resolution of racemic N-formyl- and N-carbamoyl-amino acids using immobilized L-N-carbamoylase and N-succinyl-amino acid racemase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, **99** (1): 283-291
- Han SW, Park ES, Dong JY, Shin JS. Active-site engineering of ω -transaminase for production of unnatural amino acids carrying a side chain bulkier than an ethyl substituent [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, **81** (20): 6994-7002
- Chiriac M, Lupan I, Bucurenci N, Popescu O, Palibroda N. Stereoselective synthesis of L-[15N] amino acids with glucose dehydrogenase and galactose mutarotase as NADH regenerating system [J]. *J Labelled Comp Radiopharm*, 2008, **51** (4): 171-174
- Kamal A, Azhar MA, Krishnaji T, Malik MS, Azeza S. Approaches based on enzyme mediated kinetic to dynamic kinetic resolutions: a versatile route for chiral intermediates [J]. *Coord Chem Rev*, 2008, **252** (5-7): 569-592
- Han H, Zhu B, Fu X, You S, Wang B, Li Z, Zhao W, Peng R, Yao Q. Overexpression of D-amino acid oxidase from *Bradyrhizobium japonicum*, enhances resistance to glyphosate in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, **34** (12): 2043-2051
- 冯利伟, 郭姣洁, 李辉欣, 徐书景, 鞠建松, 赵宝华. 原玻璃蝇节杆菌D-氨基酸氧化酶及突变体的酶学特性[J]. 微生物学报, 2014, **54** (8): 897-904 [Feng LW, Guo JJ, Li HX, Xu SJ, Ju JX, Zhao BH. Enzymatic properties of D-amino acid oxidase and its mutant from *Arthrobacter* [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2014, **54** (8): 897-904]
- Koszelewski D, Tauber K, Faber K, Kroutil W. ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, **28** (6): 324-332
- Caligiuri A, D'Arrigo P, Rosini E, Tessaro D, Molla G, Servi S, Pollegioni L. Enzymatic conversion of unnatural amino acids by Yeast D-amino acid oxidase [J]. *Adv Synth Catal*, 2006, **348** (15): 2183-2190
- 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 [Huang CH, Lin CS. Advances in leucine dehydrogenase and its industrial application [J]. *Amino Acids Biotic Resour*, 2012, **34** (2): 16-20]
- Wichmann R, Vasic-Racki D. Cofactor Regeneration at the Lab Scale. Technology Transfer in Biotechnology [M]. New York: Springer, 2005: 225-260
- 黄志华, 刘铭, 王宝光, 张延平, 曹竹安. 甲酸脱氢酶用于辅酶NADH再生的研究进展[J]. 过程工程学报, 2006, **6** (6): 1011-1016 [Huang ZH, Liu M, Wang BG, Zhang YP, Cao ZA. Advances in Formate dehydrogenase for NADH regeneration [J]. *Chin J Process Eng*, 2006, **6**

- (6): 1011-1016]
- 16 刘维明, 沈东, 黄和, 胡焱. 共表达亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶重组 *E. coli* 催化合成 *L*-叔亮氨酸[C]//中国化学会第 29 届学术年会论文集-第28分会: 绿色化学, 北京, 2014 [Liu WM, Shen D, Huang H, Hu Y. Synthesis of *L*-tert-leucine by co-expression of leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase in recombinant *E. coli* [C]//The 29th Annual Meeting of the Chinese Chemical Society - Chapter 28: Green Chemistry, Beijing, 2014]
- 17 张乐乐, 张显, 邵明龙, 陈榕榕, 饶志明, 李会, 许正宏. 表达 3-甾酮- Δ -脱氢酶降解植物甾醇合成雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮[J]. 生物工程学报, 2015, **31** (11): 1589-1600 [Zhang LL, Zhang X, Shao ML, Chen RR, Rao ZM, Li H, Xu ZH. Overexpressing 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase for degrading phytosterols into androst-1,4-diene-3,17-dione[J]. *Chin J Biotechnol*, 2015, **31** (11): 1589-1600]
- 18 Denton JR, Dermenjjan RK, Mao B. Development of an enantiomeric separation of *D* and *L* valine as their corresponding isoindole adducts by RP-HPLC for utilization of the *L*-valine toward pharmaceutically relevant materials [J]. *Anal Methods*, 2014, **6** (16): 6565-6570
- 19 刘维明, 杨震炯, 罗积杏, 壮晓健, 沈文和, 胡焱, 黄和. 重组大肠杆菌共表达亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶发酵条件优化[J]. 生物加工过程, 2015, **13** (4): 23-28 [Liu WM, Yang ZJ, Luo JX, Zhuang XJ, Shen WH, Hu Y, Huang H. Optimization of fermentation conditions of recombinant *Escherichia coli* co-expressing leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2015, **13** (4): 23-28]
- 20 和斐, 杨套伟, 徐美娟, 张显, 饶志明, 唐蕾. 利用重组钝齿棒杆菌高效合成 *L*-茶氨酸[J]. 微生物学报, 2016, **56** (10): 1595-1605 [He F, Yang TW, Xu MJ, Zhang X, Rao ZM, Tang L. Efficient synthesis of *L*-theanine by recombinant strain *Corynebacterium glutamicum* SYPA5-5 [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2016, **56** (10): 1595-1605]
- 21 秦敬儒, 徐美娟, 张显, 杨套伟, 许正宏, 饶志明. 一株联产 *L*-精氨酸和聚羟基丁酸酯的重组钝齿棒杆菌的构建[J]. 食品与生物技术学报, 2016, **35** (3): 240-246 [Qin JR, Xu MJ, Zhang X, Yang TW, Xu ZH, Rao ZM. Co-production of *L*-arginine and polyhydroxybutyrate in recombinant *Corynebacterium crenatum* [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2016, **35** (3): 240-246]
- 22 El-Magd RA, Park HK, Kawazoe T, Iwana S, Ono K, Chung S. The effect of risperidone on *D*-amino acid oxidase activity as a hypothesis for a novel mechanism of action in the treatment of schizophrenia [J]. *J Psychopharmacol*, 2010, **24** (7): 1055-1067
- 23 Smith SM, Uslander JM, Yao L, Mullins CM, Surles. The behavioral and neurochemical effects of a novel *D*-amino acid oxidase inhibitor compound 8 [4H-thieno [3, 2-b] pyrrole-5-carboxylic acid] and *D*-serine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, **328** (3): 921-930
- 24 Fernández-Lafuente R, Rodríguez V, Mateo C. Stabilization of enzymes (*D*-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 1999, **7** (1): 173-179