

共表达 SHMT 和 TPase 载体的构建及双酶法合成 L-色氨酸

李鑫, 刘军, 赵沁沁, 徐爱才

武汉工业学院生物与制药工程学院, 武汉 430023

摘要: 利用重组大肠杆菌表达丝氨酸羟甲基转移酶 (SHMT) 和色氨酸酶 (TPase), 并利用双酶法合成 L-色氨酸。采用 PCR 从大肠杆菌 K12 基因组中扩增上述两种酶的基因, 利用 pET-28a 载体, 构建单表达重组质粒 pET-SHMT、pET-TPase 和共表达重组质粒 pET-ST。将上述 3 种重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3) 进行表达。SDS-PAGE 结果表明, 单表达基因工程菌 BL21(DE3)/pET-SHMT 和 BL21(DE3)/pET-TPase 分别在 47 kDa (SHMT) 和 50 kDa (TPase) 处有蛋白表达带; 共表达基因工程菌 BL21(DE3)/pET-ST 在上述两处均有蛋白表达带。与宿主菌相比, 单表达 SHMT 基因工程菌产酶活性提高了 6.4 倍; 单表达 TPase 基因工程菌产酶活性提高了 8.4 倍; 共表达 SHMT 和 TPase 基因工程菌产酶活性分别提高了 6.1 和 6.9 倍。利用工程菌所产酶进行双菌双酶法和单菌双酶法合成 L-色氨酸。两菌双酶合成 L-色氨酸的累积量达到 41.5 g/L, 甘氨酸转化率为 83.3%, 吲哚转化率为 92.5%; 单菌双酶合成 L-色氨酸的累积量达到 28.9 g/L, 甘氨酸转化率为 82.7%, 吲哚转化率为 82.9%。

关键词: 丝氨酸羟甲基转移酶, 色氨酸酶, 串联表达, 双酶法合成

Construction of co-expression SHMT and TPase recombinant vector and dual-enzymatic synthesis of L-tryptophan

Xin Li, Jun Liu, Qinqin Zhao, and Aicai Xu

College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China

Abstract: Hydroxymethyltransferase (SHMT) and tryptophanase (TPase) are key enzymes in biosynthesis of L-tryptophan. We constructed three recombinant plasmids, including pET-SHMT, pET-TPase, and pET-ST for over-expression or co-expression of SHMT and TPase in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The SDS-PAGE analysis showed that the recombinant proteins of 47 kDa and 50 kDa were expressed of pET-SHMT and pET-TPase, respectively. As compared to the host strain, the enzyme activity of SHMT and TPase was increased by 6.4 and 8.4 folds, respectively. Co-expression of both recombinant proteins, 47 kDa and 50 kDa, was also successful by using pET-ST and the enzyme activities were enhanced by 6.1 and 6.9 folds. We designed two pathways of dual-enzymatic synthesis of L-tryptophan by using these recombinant strains as source of SHMT and TPase. In the first pathway, the pET-SHMT carrying strain was used to catalyze synthesis of L-serine, which was further transformed into L-tryptophan by the pET-TPase expressing strain. These two steps sequentially took place in different bioreactors. In the second pathway, the pET-ST

Received: November 18, 2009; **Accepted:** June 7, 2010

Supported by: Educational Commission of Hubei Province of China (No. D200718002).

Corresponding author: Jun Liu. Tel: +86-27-83956793; E-mail: Junliu85@yahoo.com.cn

湖北省教育厅重点项目 (No. D200718002) 资助。

carrying strain, in which two enzymes were co-expressed, was used to catalyze simultaneously two steps in a single bioreactor. HPLC analysis indicated a high yield of 41.5 g/L of L-tryptophan was achieved in the first pathway, while a lower yield of 28.9 g/L was observed in the second pathway. In the first pathway, the calculated conversion rates for L-glycine and indole were 83.3% and 92.5%, respectively. In the second pathway, a comparable conversion rate, 82.7%, was achieved for L-glycine, while conversion of indole was much lower, only 82.9%.

Keywords: hydroxymethyltransferase, tryptophanase, co-expression, dual-enzymatic synthesis

L-色氨酸是人和动物重要的必需氨基酸, 在医药、食品和饲料添加剂等方面具有广泛的用途。它是我国目前尚未实现工业化生产的少数几种氨基酸之一, 每年需要大量进口。L-色氨酸生产方法有提取法、化学合成法、微生物发酵法和酶促转化法。其中, 前 3 种方法存在材料来源有限、需多步合成工艺和光学拆分以及得率低、周期长等缺点, 而酶促转化法具有终产物积累量高、反应周期短、分离提纯容易等优点, 是廉价生产 L-色氨酸有效的方法^[1-2]。以 L-丝氨酸和吲哚为原料的酶法途径, 是酶法生产 L-色氨酸的一条重要途径^[3], 其主要缺陷是 L-丝氨酸价格贵, 与 L-色氨酸价格几乎相当。若能以廉价的原料生产丝氨酸, 再以所得到的丝氨酸为原料生产 L-色氨酸, 则可望实现 L-色氨酸的廉价生产。Hatakeyama 等^[4]报道了两步酶法合成 L-色氨酸: 以价廉的甘氨酸和甲醛为原料, 在丝氨酸羟甲基转移酶的作用下, 将甘氨酸和甲醛转化为 L-丝氨酸; 再在色氨酸酶的作用下, 添加吲哚, 则 L-丝氨酸可转变为 L-色氨酸。在国内, 韦平和等^[5]也提出了两步酶法合成 L-色氨酸。但 Hatakeyama 等所用的酶来自两种微生物细胞, 增加了生产工艺的复杂性和成本。迄今未见单一细胞同时生产丝氨酸羟甲基转移酶和色氨酸酶, 并用于酶法生产 L-色氨酸的报道。

本研究构建单表达 SHMT 基因工程菌、单表达 TPase 基因工程菌、共表达 SHMT 和 TPase 基因工程菌。利用构建的 3 种基因工程菌株, 进行两菌两次发酵产酶和单菌一次发酵产酶。采用双菌双酶法和单菌双酶法两种途径完成酶法合成 L-色氨酸, 对两种酶法合成途径进行比较, 以期达到简化产酶菌的发酵和酶促转化工艺, 降低 L-色氨酸生产成本, 为实现 L-色氨酸的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株

pET-28a 表达载体、大肠杆菌 K12、大肠杆菌 BL21(DE3) 为本实验室保存。

1.1.2 生化试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 *Pyrobest*TM DNA 聚合酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒小量提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、细菌基因组提取试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 丙烯酰胺 (Acr) 及甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 购自 Fluka 公司; 四甲基乙二胺 (TEMED) 及磷酸吡哆醛 (PLP) 购自 Sigma 公司; 四氢叶酸为本实验室自制 (硼氢化钠还原法^[6]); 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器

高效液相色谱仪 (安捷伦 1200 HPLC); 泵 (安捷伦 1100/1200 四元泵); 检测器 (安捷伦 1200 可变波长检测器)。

1.2 方法

1.2.1 基因的 PCR 扩增

PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')
SHMT-F	CATGCCATGGGCTTAAAGCGTGAATGAACA TTG (the underline indicates <i>Nco</i> I)
SHMT-R	CGAGGATCCTTATGCGTAAACCGGGTAAC (the underline indicates <i>Bam</i> H I)
TPase-F	CATGCCATGGGCGAAAACTTTAAACATCTCC CT (the underline indicates <i>Nco</i> I)
TPase-R	CGAGGATCCTTAAACTTCTTTAAGTTTTGCG (the underline indicates <i>Bam</i> H I)

PCR 反应体系 (50 μ L): 无菌三蒸水 40 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, dNTPs 1 μ L, *Pyrobest* DNA 聚合酶 1 μ L。两基因 PCR 反应条件均为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 表达载体的构建

将 PCR 扩增到的编码 SHMT 和 TPase 的基因分别连接到 pET-28a 载体上, 构建单表达重组质粒 pET-SHMT 和 pET-TPase, 再利用以上两个重组质粒构建共表达重组质粒 pET-ST。PCR 产物纯化和凝胶回收按试剂盒说明书进行操作, 基因的酶切和连接按所用酶的商品说明书进行操作。

1.2.3 重组工程菌的诱导及酶活测定

将重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3), 构建基因工程菌。利用重组菌进行发酵产酶 (方法参照 pET 操作手册), 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析蛋白表达情况^[7], 并对重组工程菌所产酶进行酶活测定 (SHMT 和 TPase 酶活测定方法参照文献 [8]和[9])。

1.2.4 双菌双酶法合成 L-色氨酸

酶促反应以 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 作为溶剂, 反应在 500 mL 四颈烧瓶中进行, 反应液体积为 350 mL, 其中加入 30 g 经 0.1% (W/V) 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 裂解液处理过的产 SHMT 的菌体, 30 g 甘氨酸, 10 mg PLP, 0.5 g 四氢叶酸, 同时向反应液中加入适量巯基乙醇, 并通氮气以免辅酶四氢叶酸被氧化^[10-11]。反应温度 37 $^{\circ}$ C, 初始 pH 为 7.5, 搅拌速度 60 r/min。另一底物甲醛初始加入的浓度控制在 20 mmol/L 以下, 此后以流加的方式加入甲醛, 维持反应液 pH 控制在 6.8~7.2。当反应液 pH 不变化时, 反应达到平衡, 停止反应。离心弃菌体, 将上述反应液装入另一反应罐, 并向其中加入 30 g 经同样方法破碎处理的产 TPase 的菌体, 9 g 吡啶, 5 mg PLP, 200 μ L TritonX-100, 反应 pH 调节到 8.8, 反应温度 37 $^{\circ}$ C, 搅拌速度 60 r/min^[5]。反应进行时每隔 6 h 检测一次反应液中吡啶浓度 (采用对二甲氨基苯甲醛作为显色剂, 进行光度定量测定^[12]), 当吡啶浓度不再变化时停止反应。

1.2.5 单菌双酶法合成 L-色氨酸

参考双菌双酶法反应条件, 将经破碎处理的产双酶的菌体、甘氨酸、吡啶、PLP 等原料一次性加入同一反应罐。为使主要反应底物甘氨酸和吡啶能被充分利用, 并得到一定积累量的 L-色氨酸, 实验设计 3 组甘氨酸和吡啶加入量, 分别为甘氨酸+吡啶: ① 20 g+5 g; ② 25 g+7 g; ③ 30 g+9 g, 辅酶等其余原料的量同比例增减。反应体积仍为 350 mL。整个反应过程中通氮气, 反应温度 37 $^{\circ}$ C, 初始 pH 为 7.5, 搅拌速度 60 r/min, 同样以流加的方式加入甲醛维持反应液 pH 控制在 6.8~7.2。当反应液 pH 不再变化以后, 每隔 2 h 检测反应液中吡啶浓度。当反应液中吡啶浓度不再变化时, 终止反应。

1.2.6 高效液相测定 L-色氨酸含量

采用安捷伦 1200 系列安捷伦 C-18 反相硅胶柱 (5 μ m; 4.6 mm \times 250 mm); 流动相: 甲醇:1%冰乙酸=10:90; 柱流量: 1 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 可变波长扫描紫外检测器 (VWD), 检测波长为 280 nm^[3]。

2 结果

2.1 重组质粒 pET-SHMT 和 pET-TPase 的构建

提取大肠杆菌 K12 基因组, PCR 分别扩增编码 SHMT 的基因和 TPase 的基因, 结果见图 1。

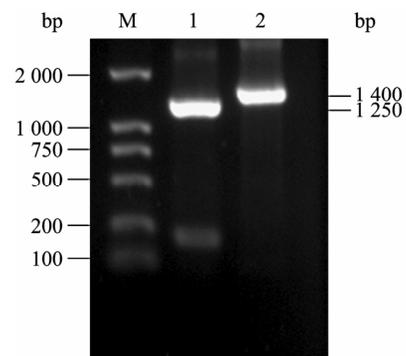


图 1 PCR 扩增编码 SHMT 和 TPase 的基因

Fig. 1 Amplification of gene coding SHMT and gene coding TPase by PCR. M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of gene coding SHMT; 2: PCR product of gene coding TPase.

扩增产物与预计大小相符。回收 PCR 产物, 经 *Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切, 分别连接到经同样双酶切的 pET-28a 上, 构建两个重组质粒 pET-SHMT 和 pET-TPase, 重组质粒构建过程见图 2。用 *Bgl* II/

Hind III 双酶切鉴定两个重组质粒, 酶切结果见图 3。酶切产生两条带, 分子量大的与经酶切后的 pET-28a 条带大小一致; 分子量小的为含有 T7 启动子和相应基因的 DNA 片段, 较各自基因的 PCR 产物分子量大。经酶切鉴定的重组质粒由上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 测序结果与报道的序列 (GenBank Accession No. NC_000913) 一致。

2.2 SHMT 和 TPase 共表达重组质粒 pET-ST 的构建

将已构建的质粒 pET-TPase 经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切, 并回收含 T7 启动子和 TPase 基因的 DNA 片段。用 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切质粒 pET-SHMT, 回收酶切质粒, 并与含 T7 启动子和 TPase 基因的 DNA 片段相连, 构建共表达重组质粒 pET-ST, 共表达重组质粒构建过程见图 2。

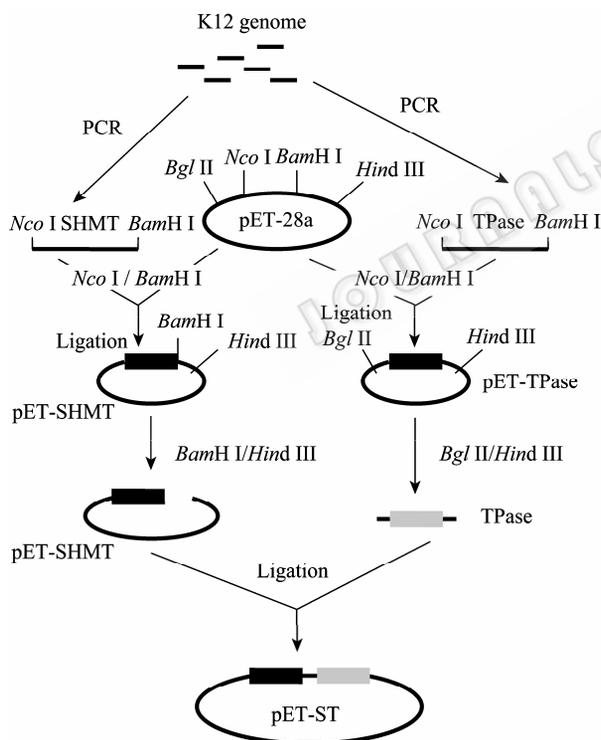


图 2 pET-SHMT、pET-TPase 和 pET-ST 重组质粒的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmids pET-SHMT, pET-TPase and pET-ST.

共表达质粒上 SHMT 和 TPase 的表达由各自的 T7 启动子控制。用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切鉴定重组质粒 pET-ST, 双酶切结果见图 3, 酶切产生的两

条带, 分子量大的条带对应经酶切后的 pET-28a 片段; 小片段的大小相当于含 T7 启动子的 SHMT 片段和含 T7 启动子的 TPase 片段之和, 表明共表达质粒构建成功。

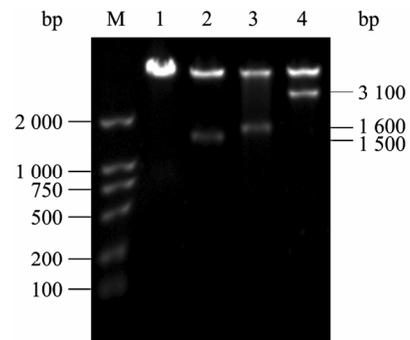


图 3 酶切鉴定 3 个重组质粒 pET-SHMT、pET-TPase 和 pET-ST

Fig. 3 Identification of pET-SHMT, pET-TPase and pET-ST recombinant plasmids. M: DNA marker DL2000; 1: digestion of plasmid pET-28a by *Bgl* II/*Hind* III; 2: digestion of plasmid pET-SHMT by *Bgl* II/*Hind* III; 3: digestion of plasmid pET-TPase by *Bgl* II/*Hind* III; 4: digestion of plasmid pET-ST by *Bgl* II/*Hind* III.

2.3 重组基因工程菌的诱导表达及酶活测定

挑取带有空载体的宿主菌 BL21(DE3)/pET-28a 及 3 种基因工程菌 BL21(DE3)/pET-SHMT、BL21(DE3)/pET-TPase 和 BL21(DE3)/pET-ST, 分别接种到装有 20 mL LB 的 100 mL 三角瓶中, 培养基中加入 50 μ g/mL 卡那霉素 (Kan), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。按 1% 接种量接入装有 50 mL LB 的 250 mL 三角瓶中, 37 $^{\circ}$ C 培养到 OD_{600} 至 0.8~1.0, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L。诱导 6 h 后, 测定 3 种重组菌所产酶的活力。

将诱导 6 h 的 2 mL 细菌培养液离心获菌体, 水洗涤一次后加入 1 mL CTAB 裂解缓冲液 (含 0.1% CTAB、0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0)) 悬浮菌体, 37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min, 离心取上清, 将上清样品和诱导 6 h 的全菌样品进行 SDS-PAGE 电泳对比分析, 结果见图 4 所示。

从全菌电泳结果可见, 诱导 6 h 后, 单表达基因工程菌 BL21(DE3)/pET-SHMT 和 BL21(DE3)/pET-TPase 分别在分子量 47 kDa (SHMT) 和 50 kDa (TPase) 处有蛋白表达带; 共表达基因工程菌

BL21(DE3)/pET-ST 在上述两处位置均有蛋白表达带。上清样品的电泳结果表明, 3 种基因工程菌诱导表达的可溶性目的蛋白量占各自上清液中蛋白总量的 50% 以上, 相比全菌中诱导表达目的蛋白的量则较少, 表明诱导产生蛋白大多以包涵体形式存在。共表达基因工程菌中可溶性 SHMT 和 TPase 的蛋白量略低于单表达 SHMT 和单表达 TPase 的可溶性蛋白量。

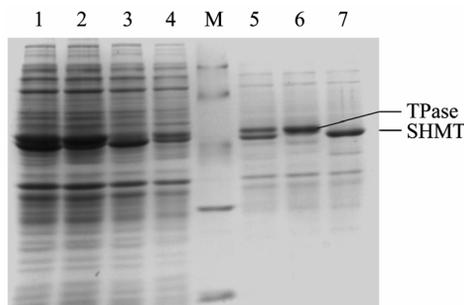


图 4 SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白在重组菌中的表达及其可溶性

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of protein expression and solubility in recombinant strains. M: protein molecular weight markers (20.1, 29.0, 44.3, 66.4, 97.2 kDa); 1: BL21(DE3)/pET-ST; 2: BL21(DE3)/pET-TPase; 3: BL21(DE3)/pET-SHMT; 4: BL21(DE3)/pET-28a; 5: soluble proteins of SHMT and TPase in BL21(DE3)/pET-ST; 6: soluble proteins of TPase in BL21(DE3)/pET-TPase; 7: soluble proteins of SHMT in BL21(DE3)/pET-SHMT.

对带有空载体的宿主菌和 3 种基因工程菌进行酶活力测定, 结果见图 5。携带空载体的宿主菌 BL21(DE3)/pET-28a, 两种单表达基因工程菌 BL21(DE3)/pET-SHMT, BL21(DE3)/pET-TPase 和共表达基因工程菌 BL21(DE3)/pET-ST 的 SHMT 酶活 (U/mL) 分别为 34.3、220.7、35.1、210.2; TPase 酶活 (U/mL) 分别为 13.5、12.8、113.7、93.5。相比携带空载体的宿主菌, 两种单表达基因工程菌 SHMT 和 TPase 酶活分别提高了 6.4 倍和 8.4 倍; 共表达基

因工程菌的 SHMT 酶活和 TPase 酶活分别提高了 6.1 倍和 6.9 倍。

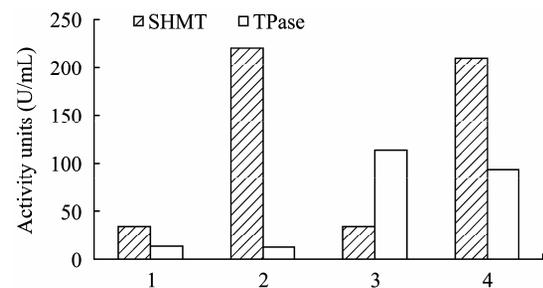


图 5 对照菌株、单表达及共表达基因工程菌株 SHMT、TPase 酶活比较

Fig. 5 Activity of the enzymes SHMT, TPase in different strains. 1: BL21(DE3)/pET-28a; 2: BL21(DE3)/pET-SHMT; 3: BL21(DE3)/pET-TPase; 4: BL21(DE3)/pET-ST.

2.4 双菌双酶法合成 L-色氨酸

转化反应分为两步在两个反应罐中进行, 第 1 步反应合成 L-丝氨酸, 反应进行 45 h 达到平衡, 消耗甲醛溶液 (甲醛含量 40%) 约 25 mL (25.4 g)。甲醛溶液以流加的方式加入, 设定 pH 高于 7.2 开始流加甲醛, pH 低于 6.8 停止流加。加入甲醛后, 反应液 pH 降低, 甲醛逐渐消耗后, 反应液 pH 缓慢回升。当反应液 pH 持续在 6.8 左右不再回升, 则反应达到平衡。以此方式加入甲醛, 其残留量很低, 消耗的甲醛全部用于合成 L-丝氨酸, 以此计算甘氨酸的转化率为 83.3%。第 2 步, 将 L-丝氨酸合成反应液转移到另一反应罐中, 加入吲哚, 在 TPase 催化下合成 L-色氨酸, 反应进行 48 h, 高效液相测定 L-色氨酸的累积量为 41.5 g/L。计算得到吲哚转化率为 92.5%。

2.5 单菌双酶法合成 L-色氨酸

利用共表达基因工程菌产两种酶, 使两步合成反应在同一反应罐中同时进行。3 组实验结果见表 2。

表 2 原料甘氨酸和吲哚在不同投料量下单菌双酶法合成 L-色氨酸

Table 2 Dual-enzymatic synthesis of L-tryptophan at different quantities of two substrates of glycine and indole

Group	Quantity of glycine (g)	Quantity of indole (g)	Reaction time (h)	Consumption of formaldehyde (g)	Conversion of glycine (%)	Conversion of indole (%)	Yield of L-tryptophan (g)
1	20	5	42	17.4	87	92.7	8.1
2	25	7	48	20.7	82.7	82.9	10.1
3	30	9	48	20.3	67.7	60.9	9.6

第 1 组实验甘氨酸和吲哚加入量少, 等体积条件下底物浓度相对较低, 在加入相同菌体量的条件下, 两种底物的转化率高, 但 L-色氨酸的累积量低于其他两组。第 2 组和第 3 组实验在反应时间、甲醛消耗量和 L-色氨酸的累积量上相差甚少, 但两种底物的转化率相差大, 推测第 3 组实验的底物加入过量, 加入原料未被酶充分利用。第 2 组实验的原料转化率和产物累积量均较高, 其最终的 L-色氨酸的累积量为 28.9 g/L, 故该组实验的原料加入量为最适。相比双菌双酶法, 单菌双酶法在反应时间上缩短 45 h, 成本更节省, 但 L-色氨酸的累积量略低。

3 讨论

以 L-丝氨酸和吲哚为原料合成 L-色氨酸的途径是酶法生产 L-色氨酸的重要途径, 该途径主要缺陷是 L-丝氨酸价格贵, 与 L-色氨酸价格几乎相当。SHMT 可利用廉价的甘氨酸和甲醛合成 L-丝氨酸, 克服了这一缺陷。催化这一酶促反应的除了色氨酸酶, 还有色氨酸合成酶。尽管色氨酸合成酶动力学特征明显优于色氨酸酶, 但原料之一的吲哚对其有强烈的抑制作用, 而色氨酸酶对吲哚具有良好的稳定性。因此, 本研究选择 SHMT 和 TPase 两种酶, 构建单表达 SHMT 基因工程菌、单表达 TPase 基因工程菌和共表达 SHMT 和 TPase 基因工程菌。一般认为, 多基因在质粒上共表达比单独表达时活性会降低。从本实验结果来看, 串联在前的 SHMT 与单独表达时相比酶活基本持平; 串联在后的 TPase 尽管酶活不如单表达高, 但与宿主菌相比提高 6.9 倍。单表达的表达到显著高于共表达, 但蛋白在表达量较高的情况下, 部分蛋白形成没有活性包涵体, 往往活性的大小与表达量之间呈非线性关系。

本研究所采用双酶法合成 L-色氨酸最大优势在于, 合成 L-丝氨酸后不经过分离、精制等步骤, 直接用于 L-色氨酸的合成, 降低了成本。我们设计了两种双酶法合成 L-色氨酸的途径: 双菌双酶法和单菌双酶法。采用双菌双酶法合成 L-色氨酸, 由于两种酶分别由两种重组菌进行表达, 其表达的可溶性蛋白量和所产生的酶的活性都要优于两种酶共表达。此途径中两步酶促反应前后分开进行, 每步反

应都可以在酶最适合的条件下进行, 前后两步反应不会互相影响, 但反应的时间相对较长, 而且反应过程中需要离心、更换反应罐等步骤, 增加了成本。实验结果显示, 利用此途径合成 L-色氨酸, 底物的转化率和产物累积量较高, 从高效液相结果可知反应副产物很少。针对双菌双酶法途径, 今后我们需要对两种酶的最佳反应条件 (包括反应的温度、pH 和原料用量等方面) 作进一步优化, 完善双菌双酶法的工艺, 期望能提高 L-色氨酸产量。单菌双酶法的优势在于可大幅缩短产酶和酶促反应的时间, 且共表达基因工程菌所产两种酶的酶活并不低。但实验结果显示此途径合成 L-色氨酸的累积量远低于双菌双酶法, 分析原因可能是在同一环境中反应, 需要兼顾两种酶的反应条件, 使两者都无法达到最高的原料利用率。因此, 单菌双酶法合成 L-色氨酸工艺条件仍需继续探究, 包括提高两种酶在同一重组菌中的表达量和酶活性, 以及在合成反应过程中使两种酶同时达到相对最佳的活性, 以期获得更高的原料转化率和产物累积量。

REFERENCES

- [1] Zhao CG, Cheng LK, Xu QY, *et al.* Advance in microbial fermentation for production of L-tryptophan. *Lett Ferment Technol*, 2008, **4**(37): 34–36.
赵春光, 程立坤, 徐庆阳, 等. 微生物法生产 L-色氨酸的研究进展. *发酵科技通讯*, 2008, **4**(37): 34–36.
- [2] Kawasaki K, Yokota A, Tomita F. L-Tryptophan production by a pyruvic acid-producing *Escherichia coli* strain carrying the *Enterobacter aerogenes* tryptophanase gene. *J Ferment Bioeng*, 1996, **82**(6): 604–606.
- [3] Mateus DMR, Alves SS, Fonseca MMRD. Kinetics of L-tryptophan production from indole and L-serine catalyzed by whole cells with tryptophanase activity. *J Biosci Bioeng*, 2004, **97**(5): 289–293.
- [4] Hatakeyama K, Goto M, Terasawa M, *et al.* Process for the preparation of L-tryptophan: US, 5776740. 1998-07-07.
- [5] Wei PH, Wu WT, Wang M. Enzymatic synthesis of L-tryptophan by tryptophanase expressed in genetic engineering strain. *Chin J Mod Appl pharm*, 1999, **16**(6): 37–39.
韦平和, 吴梧桐, 王旻. 色氨酸酶基因工程菌酶法合成 L-色氨酸. *中国现代应用药理学*, 1999, **16**(6): 37–39.

- [6] Sun J, Wu WT, Chen ZH. Synthesis of coenzyme THFA and determination of its relative activity. *Pharm Biotechnol*, 2000, 7(1): 38-41.
孙进, 吴梧桐, 陈志宏. 辅酶四氢叶酸的合成及其活力测定. *药物生物技术*, 2000, 7(1): 38-41.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 908-938.
- [8] Cai YY, Wu WT, Shi YD. Construction and high-rate expression of SHMT genetic bacteria. *Chin J Biotech*, 1996, 12: 28-33.
蔡宇暘, 吴梧桐, 史燕东. SHMT 基因工程菌的构建及高效表达. *生物工程学报*, 1996, 12: 28-33.
- [9] Wei PH, Wu WT, Zhang YB. Molecular cloning and expression of tryptophanase gene of *Escherichia coli*. *J China Pharm Univ*, 1999, 30(2): 139-142.
韦平和, 吴梧桐, 张玉彬. 大肠杆菌色氨酸酶基因的克隆与表达. *中国药科大学学报*, 1999, 30(2): 139-142.
- [10] Chen ZH, Wu WT, Xiang B, et al. The activity assay of recombined SHMT and the optimization of the enzymatic reaction. *Pharm Biotechnol*, 1998, 5(2): 75-79.
陈志宏, 吴梧桐, 项冰, 等. 重组丝氨酸羟甲基转移酶活性测定及酶促反应条件的优化研究. *药物生物技术*, 1998, 5(2): 75-79.
- [11] Hsiao HY, Wei T, Campell K. Enzymatic production of L-Serine. *Biotechnol Bioeng*, 1986, 28(6): 857-867.
- [12] Hu YH, Ouyang PK, Yang WG. A spectrophotometric method for the determination of indole with p-dimethylaminobenzaldehyde. *Chin J Anal Chem*, 1994, 22(10): 1083.
胡永红, 欧阳平凯, 杨文革. 对二甲氨基苯甲醛光度法测定吲哚. *分析化学*, 1994, 22(10): 1083.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

2010 工业生物技术发展报告

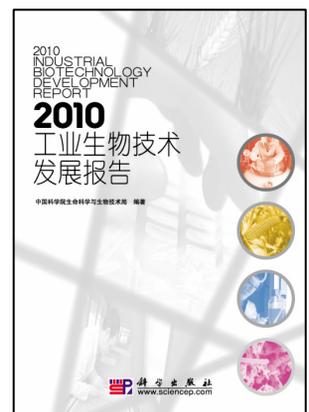
中国科学院生命科学与生物技术局 编著

978-7-03-028270-5 ¥ 80.00 2010 年 7 月

内容简介

本书是基于工业生物技术知识环境出版的信息产品之一,主要报道了工业生物技术领域内的重大规划与政策、技术和产品的研发进展、产业发展等。为了能够全面了解工业生物技术发展的最新进展,本书设置了发展战略篇、研发进展篇和产业篇。在选题上,着重突出了工业生物技术领域的热点和前沿。为了突出各领域的技术进展并使内容更有层次感,本书在研发进展篇采用主题的形式组织稿件,重点报道了微生物资源、合成生物学、系统生物学、细胞工厂和微藻在工业生物技术领域中的研发进展等内容。为了扩大本报告的读者范围,使国外读者能了解中国工业生物技术的现状、产业情况,我们在形式上增加了英文题名、摘要,以及英文作者简介。此外,我们通过对 2009 年国内外工业生物技术领域重要事件的回顾,与读者一起梳理过去一年本领域发展的整体脉络。

本书可供相关科研院所、高等院校和企业等从事工业生物技术研究 and 开发工作的科研管理人员、科研工作者和研发生产人员借鉴与参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目