

# 基于多酶级联协调表达策略高效催化合成 (S)-2-羟基丁酸

田灵芝, 周俊平, 杨套伟, 张显, 邵明龙, 徐美娟, 饶志明

江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

田灵芝, 周俊平, 杨套伟, 等. 基于多酶级联协调表达策略高效催化合成 (S)-2-羟基丁酸. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4231-4242.

Tian LZ, Zhou JP, Yang TW, et al. Efficient cascade biosynthesis of (S)-2-hydroxybutyric acid. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4231-4242.

**摘要:** 2-羟基丁酸 (2-hydroxybutyric acid, 2-HBA) 是合成生物可降解材料和各种药物的重要中间体, 化学法合成的外消旋 2-HBA 需要去消旋才能获得光学绝对映异构体, 应用于工业。文中通过在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中共表达苏氨酸脱氨酶 (Threonine deaminase, TD)、L-乳酸脱氢酶 (L-lactate dehydrogenase, LDH) 和甲酸脱氢酶 (Formate dehydrogenase, FDH), 构建 (S)-2-HBA 的合成途径及其辅因子 NADH 的循环系统, 实现了基于三酶级联反应催化底物 L-苏氨酸合成 (S)-2-HBA。为了解决多酶级联催化反应中中间产物 2-酮丁酸的生成速率和消耗率不匹配的问题, 文中通过启动子工程策略来调控 TD 和 FDH 的表达水平, 获得了多酶催化速率平衡的重组大肠杆菌 P21285FDH-T7<sub>V7827</sub>。在 5 L 发酵罐水平, 全细胞催化反应 16 h, (S)-2-HBA 的最高产量为 143 g/L, 摩尔转化率为 97%, 为迄今报道的最高产量的 1.83 倍, 使其具有较强的工业化应用潜力。此外, 结果表明, 在单细胞中构建可调节的多酶协调表达系统对生物催化制备羧基酸类化合物具有重要意义。

**关键词:** 级联生物催化, (S)-2-羟基丁酸, 多酶协调表达系统, NADH 循环, 启动子工程

**Received:** January 15, 2021; **Accepted:** March 24, 2021

**Supported by:** National Light Industry Technology and Engineering First-Class Subject Independent Project, China (No. LITE2018-06), National Natural Science Foundation of China (Nos. 32070035, 31770058), National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900300), Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20181205), Ningxia Hui Autonomous Region Key Research and Development Program, China (No. 2019BCH01002).

**Corresponding author:** Zhiming Rao. Tel/Fax: +86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-06), 国家自然科学基金 (Nos. 32070035, 31770058), 国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900300), 江苏省自然科学基金 (No. BK20181205), 宁夏回族自治区重点研发计划 (No. 2019BCH01002) 资助。

# Efficient cascade biosynthesis of (*S*)-2-hydroxybutyric acid

Lingzhi Tian, Junping Zhou, Taowei Yang, Xian Zhang, Minglong Shao, Meijuan Xu, and Zhiming Rao

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** 2-Hydroxybutyric acid (2-HBA) is an important intermediate for synthesizing biodegradable materials and various medicines. Chemically synthesized racemized 2-HBA requires deracemization to obtain optically pure enantiomers for industrial application. In this study, we designed a cascade biosynthesis system in *Escherichia coli* BL21 by coexpressing L-threonine deaminase (TD), NAD-dependent L-lactate dehydrogenase (LDH) and formate dehydrogenase (FDH) for production of optically pure (*S*)-2-HBA from bulk chemical L-threonine (L-Thr). To coordinate the production rate and the consumption rate of the intermediate 2-oxobutyric acid in the multi-enzyme cascade catalytic reactions, we explored promoter engineering to regulate the expression levels of TD and FDH, and developed a recombinant strain P21285FDH-T7<sub>V7827</sub> with a tunable system to achieve a coordinated multi-enzyme expression. The recombinant strain P21285FDH-T7<sub>V7827</sub> was able to efficiently produce (*S*)-2-HBA with the highest titer of 143 g/L and a molar yield of 97% achieved within 16 hours. This titer was approximately 1.83 times than that of the highest yield reported to date, showing great potential for industrial application. Our results indicated that constructing a multi-enzyme-coordinated expression system in a single cell significantly contributed to the biosynthesis of hydroxyl acids.

**Keywords:** cascade biocatalysis, (*S*)-2-hydroxybutyric acid, multi-enzyme-coordinated expression system, NADH regeneration, promoter engineering

2-羟基丁酸 (2-hydroxybutyric acid, 2-HBA) 是合成可降解材料和一些药物必不可少的中间体<sup>[1-2]</sup>。通过化学法从石油化工资源中获得的 2-HBA, 通常以两种光学异构体混合物 (*S*-2-HBA/*R*-2-HBA) 的形式存在<sup>[3-5]</sup>。然而, 外消旋的 2-HBA 需要去消旋以获得光学纯 2-HBA, 才能应用于手性中间体、生物可降解材料和化学工业等行业。其中, *S*-2-HBA 可用于合成左乙拉西坦和溴西拉坦 (两种抗癫痫药)<sup>[6]</sup>、过氧化物酶体增殖物激活受体的激活剂 (*R*)-K-1367 和具有抗病毒活性的荆芥苷 359 等<sup>[7-8]</sup>。*(S)*-2-HBA 的合成方法主要包括外消旋混合物的酶动力学拆分法<sup>[9]</sup>和 2-酮丁酸 (2-OBA) 的不对称生物还原法<sup>[10]</sup>。这些方法中的底物都是非商品化的化学品。直到最近, Yao 等<sup>[11]</sup>分别采用单独表达和共表达苏氨酸脱氨酶 (Threonine deaminase, TD)、甲酸脱氢酶 (Formate dehydrogenase, FDH) 和乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 的方法, 构建重组大肠杆菌, 并利用多酶催化法以大宗化学品 L-苏氨酸 (L-Thr) 为底物制备光学纯

2-HBA。但是, 多酶催化速率不匹配, 通常是影响多酶催化体系转化效率的重要因素, 进一步调节酶的表达、优化催化反应步骤、构建多酶协调表达系统至关重要<sup>[12]</sup>。

目前, 原始启动子替换、启动子理性设计、启动子文库构建等启动子工程广泛应用于调控基因表达水平<sup>[13-14]</sup>, 通过启动子工程化, 可以获得针对特定基因的特定强度的启动子序列, 合理和精确地控制多基因途径中基因的表达, 可以在相当规模上实现对蛋白质表达水平的精确调控和合理控制。在多酶级联催化体系中, 通过协调酶的表达水平, 解决多酶催化速率不匹配的问题, 实现途径中多酶反应步骤的动力学平衡<sup>[14-15]</sup>, 显著影响转化效率并最大化目标产物的合成<sup>[13]</sup>。

因此, 本研究从 Komura 等<sup>[16]</sup>构建的 T7 启动子突变体文库中筛选具有不同转录水平的 T7 启动子突变体, 探索合适的 TD 表达水平; 从 Wang 等<sup>[17]</sup>构建的合成启动子文库中选择强合成启动子, 用于提高 FDH 表达量从而获得高效的 NADH

胞内再生能力。同时,共表达  $\text{NAD}^+$  依赖型 L-LDH,成功获得了一株能实现多酶协调表达的重组大肠杆菌,该菌株具有高效转化 L-Thr 产 (S)-2-HBA 的能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒与引物

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、*E. coli* BL21(DE3) 由本实验室保藏;克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司;表达载体 pET-28a(+) 购自 Novagen 公司;本研究用 PCR 引物见表 1,由 Vazyme Biotech 公司合成。

#### 1.1.2 实验试剂

质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 试剂盒等购自 TaKaRa 公司。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Vazyme Biotech 公司。异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、抗生素和蛋白分子量标准 Marker 等购自生物工程(上海)股份有限公司。(S)-2-HBA、2-OBA 等标准品购自 Sigma 公司。其余色谱纯试剂及分析纯试剂购自国药集团。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组菌株构建

分别以 *E. coli* BL21(DE3) 和博伊丁假丝酵母 *Candida boidinii* 的全基因组为模板,使用特异性引物克隆编码 TD 和 FDH 的目的基因 *EcivlA* (GenBank 登录号: P04968.1) 和 *Cbfdh* (GenBank 登录号: AIY34662.1)。编码 LDH 的基因 *Pfldh* (GenBank 登录号: AIU41774.1) 来自恶性疟原虫 *Plasmodium falciparum*, 由 Vazyme Biotech 公司合成。分别经限制性内切酶 (*Nde* I, *Xho* I)、(*Xba* I, *Not* I) 和 (*Sph* I, *Bgl* II) 双酶切目的基因片段,并连接于表达载体 pET28a(+), 获得重组质粒 pET28a-*EcivlA*、pET28a-*Pfldh* 和 pET28a-*Cbfdh*。最后将构建完成的质粒导入

*E. coli* BL21(DE3), 获得重组基因工程菌株 *E. coli* BL21 pET28a-*EcivlA*、*E. coli* BL21 pET28a-*Cbfdh* 和 *E. coli* BL21 pET28a-*Pfldh*。用同样酶切连接的方式构建重组质粒 pET28a-*Pfldh*-T7*Cbfdh*, 获得共表达 *Pfldh* 和 *Cbfdh* 基因的重组菌株 *E. coli* BL21 pET28a-*Pfldh*-T7*Cbfdh*。

在构建三酶共表达重组菌株时,首先,分别经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切质粒 pET28a-*Pfldh*-T7*Cbfdh* 和 pET28a-T7*EcivlA*, 胶回收 pET28a-*Pfldh*-T7*Cbfdh* 质粒片段和 T7*EcivlA* 基因片段, T4 DNA 连接酶连接构建重组质粒 pET28a-*Pfldh*-T7*Cbfdh*-T7*EcivlA* 并转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,在含有卡那霉素 (Kan) 的 Luria-Bertani (LB) 平板上筛选阳性克隆,得到共表达 *EcTD*、*PfLDH* 和 *CbFDH* 的重组菌株 *E. coli* BL21 pET28a-*Pfldh*-T7*Cbfdh*-T7*EcivlA*, 该重组菌株被命名为 FDH-T7。

Komura 等<sup>[16]</sup>通过随机突变,高通量筛选方法以及二代测序技术,获得了 7 847 个具有不同表达强度的 T7 启动子突变体, Wang 等<sup>[17]</sup>通过重组 sigma 因子结合的-35 区和-10 区序列构建具有不同表达强度的合成启动子文库,分别从文献中选取具有差异性的 T7 启动子突变体和具有较高表达强度的合成启动子,分别以质粒 pET28a-*EcivlA* 和 pET28a-*Cbfdh* 为模板,用表 1 中的引物,反向全质粒 PCR 扩增获得携带有强合成启动子 P21285、P21265 和 P191 的质粒 pET28a-P21285*Cbfdh*、pET28a-P21265*Cbfdh*、pET28a-P191*Cbfdh* 和携带不同强度 T7 启动子突变体 T7<sub>V7839</sub>、T7<sub>V7835</sub>、T7<sub>V7832</sub>、T7<sub>V7827</sub>、T7<sub>V7814</sub>、T7<sub>V7802</sub> 和 T7<sub>V7797</sub> 的质粒 pET28a-T7<sub>V7839</sub>*EcivlA*、pET28a-T7<sub>V7835</sub>*EcivlA*、pET28a-T7<sub>V7832</sub>*EcivlA*、pET28a-T7<sub>V7827</sub>*EcivlA*、pET28a-T7<sub>V7814</sub>*EcivlA*、pET28a-T7<sub>V7802</sub>*EcivlA* 和 pET28a-T7<sub>V7797</sub>*EcivlA*。PCR 产物经 *Dpn* I 酶消化后,转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,在含有 Kan 的 LB 培养基上筛选阳性转化子,并测序验

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')
<i>EcivlA-Nde</i> I-F	TTCCATATGATGGCTGACTCGCAACCCCT
<i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGCTAACCCGCCAAAAAGAACCTGAAC
T7- <i>EcivlA-Nde</i> I-F	<b>GGAATTCATTAATACGACTCACTATAGGATGGCTGACTCGCAACCCCT</b>
T7- <i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGCTAACCCGCCAAAAAGAACCTGAAC
T7 <sub>V7839</sub> - <i>EcivlA-Nde</i> I-F	TTCCATATGTAATACGACTCACTAAAGGGGAATTGTGAGC
T7 <sub>V7839</sub> - <i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGCCGCTCACAATCCCCTTTAGTGAGTCGTAT
T7 <sub>V7835</sub> - <i>EcivlA-Nde</i> I-F	TTCCATATGGATCCCGCGAAATTATTACGACTCACTATAGG
T7 <sub>V7835</sub> - <i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGCCTATAGTGAGTCGTAATAATTCGCGGGAT
T7 <sub>V7832</sub> - <i>EcivlA-Nde</i> I-F	TTCCATATGCGATCCCGCGAAATTAATATGACTCACTATAGGGGAAT
T7 <sub>V7832</sub> - <i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGAATCCCCTATAGTGAGTCATATTAATTCGCGGG
T7 <sub>V7827</sub> - <i>EcivlA-Nde</i> I-F	TTCCATATGTGATCCCGCGAAATATATACGACTCACTATAGG
T7 <sub>V7827</sub> - <i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGCCTATAGTGAGTCGTATATATTCGCGGGATCG
T7 <sub>V7814</sub> - <i>EcivlA-Nde</i> I-F	TTCCATATGATTAATACGACTCACTAGAGGGGAATTGTGAG
T7 <sub>V7814</sub> - <i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGCCGCTCACAATCCCCTCTAGTGAGTCGTATTA
T7 <sub>V7802</sub> - <i>EcivlA-Nde</i> I-F	TTCCATATGGAAATTAATACGACTCACGATAGGGGAATTGTG
T7 <sub>V7802</sub> - <i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGCGCTCACAATCCCCTATCGTGAGTCGTATTA
T7 <sub>V7797</sub> - <i>EcivlA-Nde</i> I-F	TTCCATATGTGATCCCGCGAAATTAATGCGACTCACTATAAGGGGAATTGT
T7 <sub>V7797</sub> - <i>EcivlA-Xho</i> I-R	CCGCTCGAGTATCCGCTCACAATCCCCTTATAGTGAGTCGCATTAATTCGC
<i>Cbfdh-Sph</i> I-F	GATGCATGCATGAAGATCGTTTTAGTCTT
T7- <i>Cbfdh-Sph</i> I-F	GATGCATGCTAATACGACTCACTATAGGATGAAGATCGTTTTAGTCTT
P21285- <i>Cbfdh-Sph</i> I-F	GATGCATGCGAACTATCGCCTTGAACATTCTCTGACCCCATGACAGTCTTGTCCGGCCCA CTTATAATGCTATACTACATATGGCAGATCTAAGGAGGAAAATATATGAAGATCGTTTTAGT CTT
P21285- <i>Cbfdh-Sph</i> I-F	GATGCATGCGAACTACCGCCTTGAACGTCGATCTGACCCCATGACATTCTTGTCTGAAGG TGTATAATGCTATACTACATATGGCAGATCT AAGGAGGAAAATATATGAAGATCGTTTTAGTCTT
P191- <i>Cbfdh-Sph</i> I-F	GATGCATGCTTGACACGAACTATGAGCCTTGATATAATTCTGACTCCCCATACATATGGC AGATCTAAGGAGGAAAATAT ATGAAGATCGTTTTAGTCTT
<i>Cbfdh-Bgl</i> II-R	GATTCTAGATTATTTCTTATCGTGCTTACCAT

The bold sequences are the restriction sites and the underlined sequences are different T7 promoter mutations.

证。用上述构建共表达重组菌株的方法构建三酶协调表达重组系统, 含有质粒将 T7<sub>V7839</sub>*EcivlA*、T7<sub>V7835</sub>*EcivlA*、T7<sub>V7832</sub>*EcivlA*、T7<sub>V7827</sub>*EcivlA*、T7<sub>V7814</sub>*EcivlA*、T7<sub>V7802</sub>*EcivlA* 和 T7<sub>V7797</sub>*EcivlA* 分别克隆到质粒 pET28a-T7*Pfldh*-P21285*Cbfdh* 中, 所获得的重组菌株分别被命名为 P21285FDH-T7<sub>V7839</sub>、P21285FDH-T7<sub>V7835</sub>、P21285FDH-T7<sub>V7832</sub>、P21285FDH-T7<sub>V7827</sub>、P21285FDH-T7<sub>V7814</sub>、P21285FDH-T7<sub>V7802</sub> 和 P21285FDH-T7<sub>V7797</sub>。

### 1.2.2 培养基与培养方法

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 用于质粒的构建、扩增和菌株培养。

TB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 24.0, 酵母粉 12.0, 甘油 4.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.2。

TY 培养基 (g/L): 酵母抽提物 8.0, 胰蛋白胨 12.0, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 4.0, NaCl 3.0, 一水合柠檬酸 2.1, 柠檬酸铁铵 0.3, 甘油 10.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, 用于重组菌株发酵培养。

补料培养基 (g/L): 甘油 400.0, 酵母抽提物 50.0, 胰蛋白胨 25.0。

种子培养条件: 从活化平板上挑取单菌落接种至 25 mL LB 液体培养基中, 添加 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 10 h。

摇瓶培养与诱导条件: 以 2% (V/V) 的接种量, 接种于 50 mL TB 培养基中, 添加终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Kan, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.8 时, 添加终浓度为 0.08 mg/L 的 IPTG 于 25  $^{\circ}\text{C}$  下诱导 8–12 h。

5 L 发酵罐培养与诱导条件: 将种子培养液按照 5% (V/V) 接种量转接于 5 L 发酵罐, 初始发酵温度 37  $^{\circ}\text{C}$ , 前 2 h 控制转速 300 r/min, 之后 3 h 内转速逐级升至 600 r/min, 在线控制 pH 7.0–7.2, 菌体培养至  $OD_{600}$  为 15–20 时, 加入终浓度约为 0.08 mg/L 的 IPTG 进行诱导表达, 期间通过补料控制溶氧水平在 30% 左右。诱导表达 12–14 h 后, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心收集菌体。

### 1.2.3 酶的纯化

离心收集到的菌体经 2 次洗涤后重悬于 50 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.5) 中, 使用超声细胞破碎仪 (宁波新芝, 中国) 进行细胞破碎, 经 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 离心收集的上清液通过 HisTrap HP 亲和层析 Ni 柱 (GE) 进行纯化<sup>[18]</sup>, 得到纯酶的均一性通过 SDS-PAGE 进行检测。

### 1.2.4 酶活检测方法

单酶表达重组菌株的粗酶液和纯酶, 以及共表达重组菌株的粗酶液用于酶活测定。

TD 酶活的测定是使用 UV-VIS 分光光度计 (Aoesch, 中国上海) 通过测量 2-OBA 在 230 nm 处的吸光值来进行的<sup>[19]</sup>。反应体系为: 40 mmol/L L-Thr 溶解在终体积为 1.6 mL 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中, 加入适量酶液, 测定反应过程中吸光值的变化。其酶活单位 (U) 定义为每分

钟催化生成 1  $\mu\text{mol}$  2-OBA 所需的酶量。

LDH 和 FDH 酶活的测定是使用 UV-VIS 分光光度计通过测量 NAD(H) 在 340 nm 处吸光值的变化来计算的<sup>[20-21]</sup>, 反应体系为: 10 mmol/L 底物, 1 mmol/L  $\text{NAD}^{+}$  或 0.5 mmol/L NADH 溶解在终体积为 1.6 mL 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中, 加入适量酶液, 测定反应过程中吸光值的变化。其酶活单位 (U) 定义为每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  NADH 或  $\text{NAD}^{+}$  所需的酶量。

### 1.2.5 体外优化多酶催化体系

分别将 *Ec*TD、*Pf*LDH 和 *Cb*FDH 按不同比例添加到 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中, 用以优化多酶催化体系, 实验获得酶法转化产 (S)-2-HBA 的最适酶活比例。首先, 固定 *Ec*TD 酶活为 25 U/mL, *Cb*FDH 酶活过量为 30 U/mL, 通过改变 *Ec*TD 与 *Pf*LDH 的酶活比例从 0.5 : 1.0–4.0 : 1.0 来优化酶反应。其次, 我们将 *Ec*TD 与 *Pf*LDH 的酶活保持在最佳比例 (固定 *Ec*TD 酶活为 25 U/mL), 通过改变 *Ec*TD 与 *Cb*FDH 的酶活比例从 1.0 : 0.1 至 1.0 : 0.5 来优化酶反应。反应体系为: 60 g/L L-Thr 溶解在终体积为 10 mL 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中, 分别将 *Ec*TD、*Pf*LDH 和 *Cb*FDH 按不同比例添加至转化液中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 条件下进行酶法转化, 反应 4 h 结束后, 通过 HPLC 测量反应溶液中的残余 L-Thr、中间产物 2-OBA 和产物 (S)-2-HBA 的量。

### 1.2.6 共表达重组菌株转化条件

摇瓶转化条件优化: 回收细胞重悬于 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中 (反应终体积为 50 mL), 根据不同的条件, 将底物 L-Thr 以不同的终浓度加入到反应缓冲液中, 加入的辅底物甲酸钠与 L-Thr 的摩尔比为 1 : 1, 在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 条件下转化 4 h。在转化过程中, 使用八联 pH 控制器在线控制 pH 为 7.5。反应过程中及反应结束后取

样,向样品中加入 15%的三氯乙酸终止反应,取 1 mL 进行适当稀释后,使用 HPLC 分析残留的 L-Thr、中间产物 2-OBA 和终产物 (S)-2-HBA。

5 L 发酵罐全细胞转化条件:回收细胞重悬于 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中 (反应终体积为 2 L),细胞浓度为 25 g DCW/L。分别于 0、4 和 8 h 向反应体系中添加 60、60 和 50 g/L 底物 L-Thr,加入的辅底物甲酸钠与 L-Thr 的摩尔比为 1:1,0.1 mol/L NaOH 溶液在线控制 pH 7.5,30 °C、400 r/min 条件下转化 16 h。每隔 4 h 取样检测,向样品中加入 15%的三氯乙酸终止反应,取 1 mL 适当稀释后,使用 HPLC 分析残留的 L-Thr、中间产物 2-OBA 和终产物(S)-2-HBA。

### 1.2.7 检测条件

底物 L-Thr 通过 HPLC 测定,通过 OPA/BOC-Cys 衍生化,并使用 LC-18DB 色谱柱 (5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm,安捷伦)在 338 nm 下通过 HPLC 分析进行测定<sup>[22]</sup>。中间产物 2-OBA 和终产物 (S)-2-HBA 通过 HPLC 测定,其色谱条件为:Bio-Rad HPX-87H 有机酸醇分析柱,柱温控制在 60 °C,流速 0.5 mL/min,波长 210 nm 紫外检测器检测<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 (S)-2-HBA 积累菌株的构建及转化

通过在 *E. coli* 中共表达编码 *EcTD*、*PfLDH* 和 *CbFDH* 三个基因,构建多酶级联催化重组大肠杆菌 FDH-T7 (图 1A),确定了从 L-Thr 向 (S)-2-HBA 的转化。为了评估重组菌株 FDH-T7 的催化效率,在维持细胞浓度为 8 g DCW/L 的条件下,考察不同的 L-Thr 浓度 (10–60 g/L) 对该重组菌合成 (S)-2-HBA 的影响。如图 1B 所示,随着 L-Thr 浓度的增加,摩尔转化率从 98.2%降至 47.5%,而 2-OBA 的浓度从 0.26 g/L 增加至 26.7 g/L。在维持细胞浓度为 2.5 g DCW/L 的条件下,进一步对 *E. coli* BL21 pET28a-*EcivlA* 和 *E. coli* BL21

pET28a-*Pfldh*-T7*Cbfdh* 转化 L-Thr 产 2-OBA 以及转化 2-OBA 产 (S)-2-HBA 的速率进行研究表明,*E. coli* BL21 pET28a-*Pfldh*-T7*Cbfdh* 对 2-OBA 的转化效率仅为 (3.72 $\pm$ 0.25) g/(L·h),为 2-OBA 合成速率 (20.70 $\pm$ 0.78) g/(L·h) 的 18% (图 1C–1D)。由此表明,该重组大肠杆菌在多酶催化过程中存在转化速率不平衡的缺陷。进一步的体外酶活数据显示,重组菌 FDH-T7 中 *EcTD*、*PfLDH* 和 *CbFDH* 的粗酶液酶活分别为 (572.6 $\pm$ 7.0) U/mL、(221.0 $\pm$ 3.0) U/mL、(23.0 $\pm$ 0.9) U/mL,其酶活比例为 2.6:1.0:0.1。因此,转化速率不匹配主要因为 *EcTD* 酶活较高,转化速率较快,提供辅因子 NADH 再生的 *CbFDH* 酶活较低,造成了 2-OBA 的消耗较慢,大大降低了整个级联反应的催化效率。基于此,提出还原性辅因子 NADH 再生是整个反应的限速步骤。

### 2.2 体外优化多酶催化体系提高 (S)-2-HBA 积累效率

在含有 60 g/L L-Thr 的重组菌株 FDH-T7 全细胞转化体系中,通过外源添加不同量的 *CbFDH* 以期获得高效的 (S)-2-HBA 的合成速率。如图 2A 所示,随着 *CbFDH* 酶活的增加,(S)-2-HBA 的产量及转化率呈上升趋势,当外源添加 *CbFDH* 酶活为 40 U/mL 时,2-OBA 的积累量为 9.6 g/L,(S)-2-HBA 的积累量为 42.8 g/L,转化率为 81%,是未经外源添加 *CbFDH* 实验组的 1.7 倍;继续提高 *CbFDH* 酶的添加量,(S)-2-HBA 的积累量并没有提升,说明在一定范围内提高 *CbFDH* 的表达量有助于解除限速步骤,提高 (S)-2-HBA 积累效率。为了获得 3 种酶的最佳比例以实现多酶反应动力学平衡,将纯酶 (图 2B) 以不同比例添加到含有 60 g/L L-Thr 的转化体系中。将 *EcTD* 的酶活保持在 25 U/mL,通过改变 *EcTD* 与 *PfLDH* 的比例来优化酶反应。如图 2C 所示,当 *EcTD* 与 *PfLDH* 的酶活比为 0.5:1.0 至 1.0:1.0 时,(S)-2-HBA 的产量和摩尔转化率均随酶活比例的增加而增

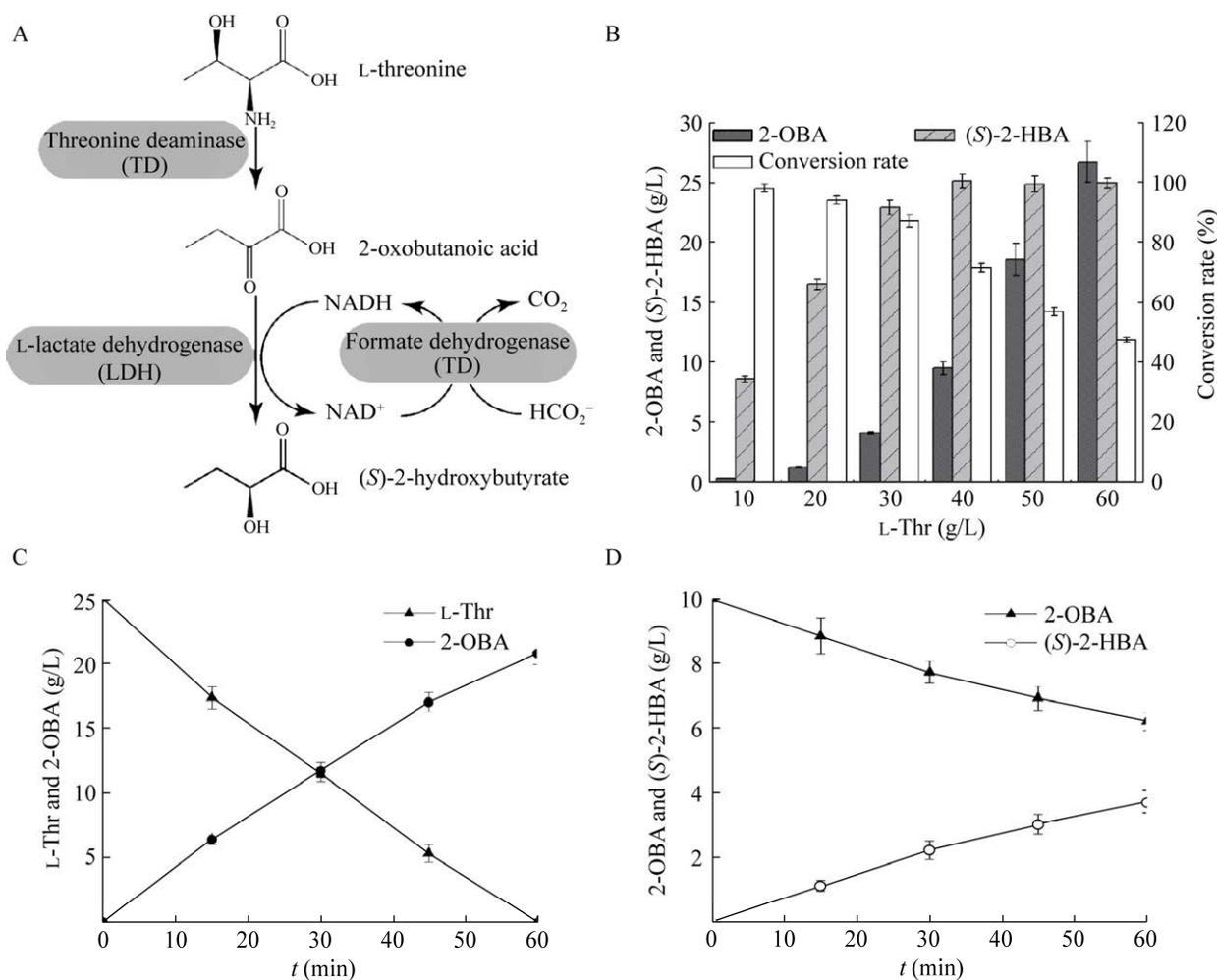


图1 (S)-2-HBA 积累菌株的构建及转化研究

Fig. 1 Construction of recombinant *E. coli* for cascade biosynthesis of (S)-2-HBA. (A) Multi-enzyme cascade biocatalysis for producing (S)-2-HBA. (B) Effect of different L-Thr concentration on (S)-2-HBA production by strain FDH-T7. (C) Production of 2-OBA from L-Thr by strain BL21 pET28a-*EcivlA*. (D) Consumption of 2-OBA for (S)-2-HBA production by strain BL21 pET28a-*Pfldh-T7Cbfdh*.

加。但是，将 *EcTD* 与 *PfLDH* 的比例更改为 1.5 : 1.0 至 4.0 : 1.0 时，(S)-2-HBA 的产量和摩尔转化率均随酶活比例的增加而降低。当 *EcTD* 与 *PfLDH* 的酶活比例为 1.0 : 1.0 至 1.5 : 1.0 时，(S)-2-HBA 的产量为 51 g/L，摩尔转化率为 97.6%±0.9%，达到较高水平。这表明平衡 L-Thr 到 2-OBA 的转化率和 2-OBA 的消耗率非常重要，*EcTD* 与 *PfLDH* 的最佳比例为 1.0 : 1.0。而当

*EcTD* 与 *CbFDH* 的活性比高于 1.0 : 0.3 时，(S)-2-HBA 的产量达到 51.5 g/L。当 *EcTD* 与 *CbFDH* 的活性比低于 1.0 : 0.3 时，(S)-2-HBA 的产量和摩尔转化率均随着 *CbFDH* 酶活比例的降低而降低。这表明系统中的 *CbFDH* 酶活应至少保持 *EcTD* 酶活的 30%，以便提供足够的辅酶 NADH。因此，确定 *EcTD*、*PfLDH* 和 *CbFDH* 的最佳酶活性比为 1.0 : 1.0 : 0.3。

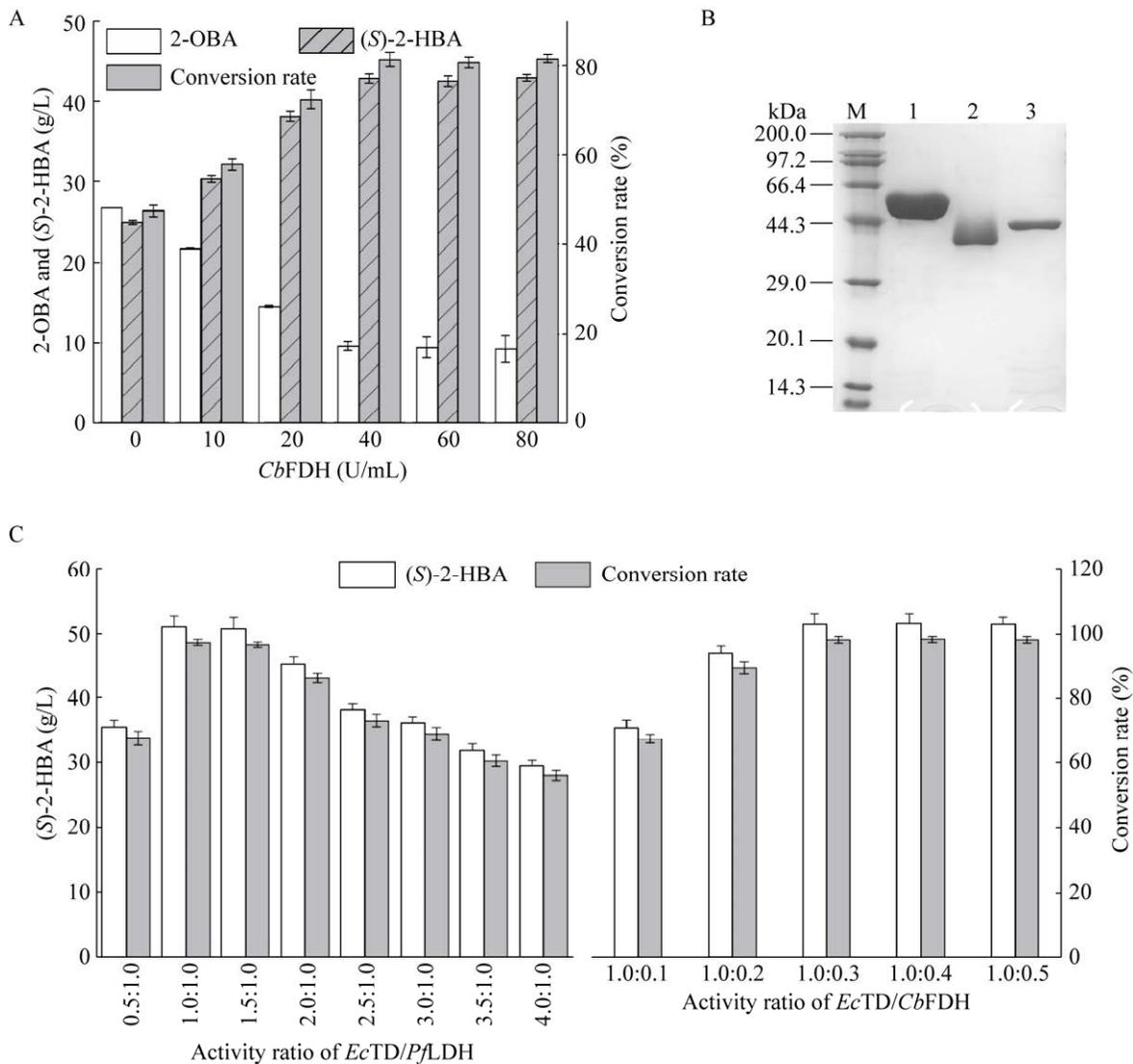


图2 体外优化多酶催化体系

Fig. 2 Optimization of the cascade biosynthesis system *in vitro*. (A) Effect on the (S)-2-HBA production by strain FDH-T7 via adding different units CbFDH. (B) SDS-PAGE analysis of purified enzymes. M: protein marker; 1: purified EcTD; 2: purified PfLDH; 3: purified CbFDH. (C) Effect of different activity ratios of EcTD/PfLDH and EcTD/CbFDH on (S)-2-HBA production.

### 2.3 基于不同强度 T7 启动子变体优化途径酶基因的表达

作为负责转录起始的基本调节元件,启动子在一定程度上调控基因的表达水平,从而改变全细胞催化体系中相应酶的酶活。为了获得高效的 NADH 胞内再生能力,选择不同梯度强度的启动子,获得不同表达强度的 CbFDH 的重组菌

(图 3A),在相同条件下,当启动子为 P21285 时,CbFDH 的相对酶活是对照组的 2.62 倍(图 3B)。

为了进一步在重组菌中实现三酶表达量成最佳配比,从 Komura 等<sup>[16]</sup>构建的 T7 启动子文库中选择具有不同表达强度的 T7 突变体来微调 EcTD 酶的表达。如图 3A 和 3C 所示,获得了 7 株具有不同表达强度的 EcTD 的重组大肠杆菌 *E. coli*

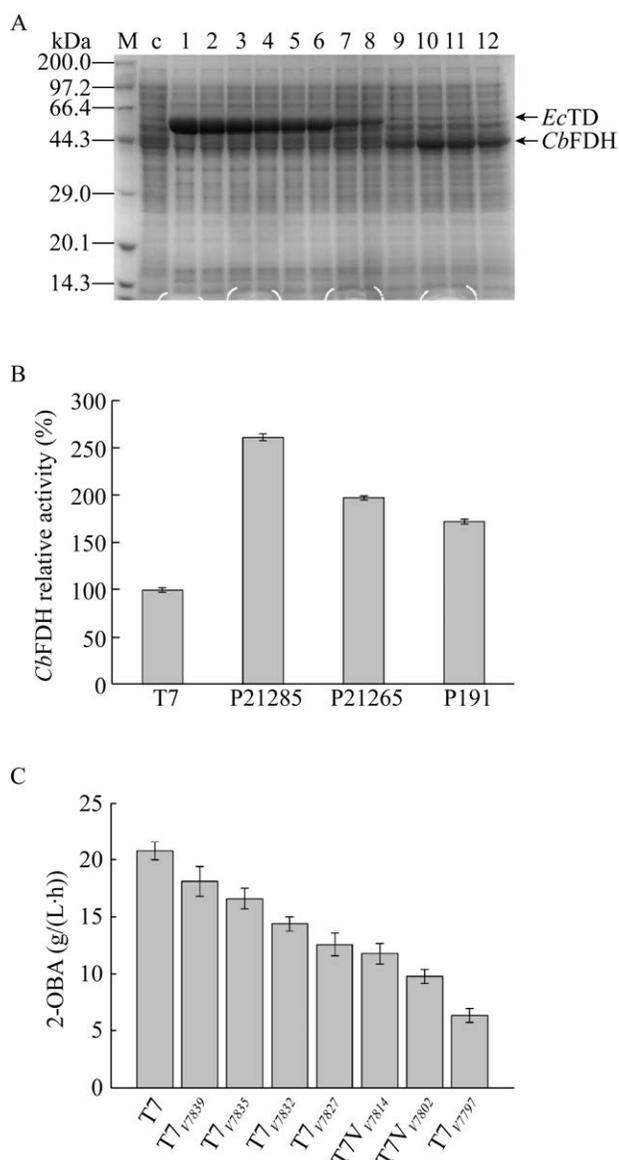


图3 基于不同强度 T7 启动子变体优化途径酶基因的表达

Fig. 3 Optimization of enzyme expression using T7 promoter variants with different strength. (A) SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli*. M: protein marker; c: *E. coli* strains harboring BL21 pET28a; different T7 promoter variants and different genes: T7*EcivlA* (1); T7<sub>V7839</sub>*EcivlA* (2); T7<sub>V7835</sub>*EcivlA* (3); T7<sub>V7832</sub>*EcivlA* (4); T7<sub>V7827</sub>*EcivlA* (5); T7<sub>V7814</sub>*EcivlA* (6); T7<sub>V7802</sub>*EcivlA* (7); T7<sub>V7797</sub>*EcivlA* (8). T7*Cbfdh* (9); P21285*Cbfdh* (10); P21265*Cbfdh* (11); P191*Cbfdh* (12). (B) The enzyme activity of CbFDH. (C) The conversion to 2-OBA by *EcTD*.

BL21 pET28a-T7<sub>V7797</sub>*ivlA*、*E. coli* BL21 pET28a-T7<sub>V7802</sub>*ivlA*、*E. coli* BL21 pET28a-T7<sub>V7814</sub>*ivlA*、*E. coli* BL21 pET28a-T7<sub>V7827</sub>*ivlA*、*E. coli* BL21 pET28a-T7<sub>V7832</sub>*ivlA*、*E. coli* BL21 pET28a-T7<sub>V7835</sub>*ivlA* 和 *E. coli* BL21 pET28a-T7<sub>V7839</sub>*ivlA*，其转化速率在 4.3–17.1 g(L·h) 之间，分别是原始对照的 30%、47%、57%、61%、69%、80% 和 87%，适合用于构建多酶协调表达系统。

#### 2.4 基于启动子优化的三酶协调表达菌株的构建及转化条件优化

在利用启动子优化单一酶 *CbFDH* 表达强度获得高效的 NADH 再生能力的基础上，本研究选择强启动子 P21285 启动 *Cbfdh* 基因的表达，通过不同强度 T7 启动子突变体 T7<sub>V7839</sub>、T7<sub>V7835</sub>、T7<sub>V7832</sub>、T7<sub>V7827</sub>、T7<sub>V7814</sub>、T7<sub>V7802</sub>、T7<sub>V7797</sub> 启动 *EcivlA* 基因的表达，同时共表达 *Pfldh* 基因，构建 7 株具有不同 TD 表达水平、FDH 表达增强的三酶共表达重组菌株。如图 4A 所示，与对照组相比，7 株重组大肠杆菌中 TD 的表达量均降低，FDH 的表达量显著提高，实现了通过启动子优化来调控酶的表达。进一步对重组菌进行胞内酶活检测显示重组大肠杆菌 P21285FDH-T7<sub>V7814</sub> 和 P21285FDH-T7<sub>V7827</sub> 胞内酶活比例 *EcTD*: *Pfldh*: *CbFDH* 分别为 0.9 : 1.0 : 0.4 和 1.1 : 1.0 : 0.4，非常接近体外实验获得的该级联反应的最佳酶活比例 1.0 : 1.0 : 0.3 (表 2)。进一步的全细胞转化实验表明，与对照组 FDH-T7 相比，菌株 P21285FDH-T7<sub>V7827</sub> 表现出较优的转化性能，催化反应过程中基本没有中间产物 2-OBA 的积累，基本实现了多酶转化速率的平衡 (图 4B)。转化 4 h，(S)-2-HBA 产量为 40.3 g/L，是对照组的 1.6 倍。以重组菌 P21285FDH-T7<sub>V7827</sub> 进行转化条件优化，固定 L-Thr 浓度为 50 g/L，考察不同菌体量对转化效率的影响，如图 4C 所示，当菌体量为 25 g DCW/L 时，转化 4 h，(S)-2-HBA 产量为 43.1 g/L，

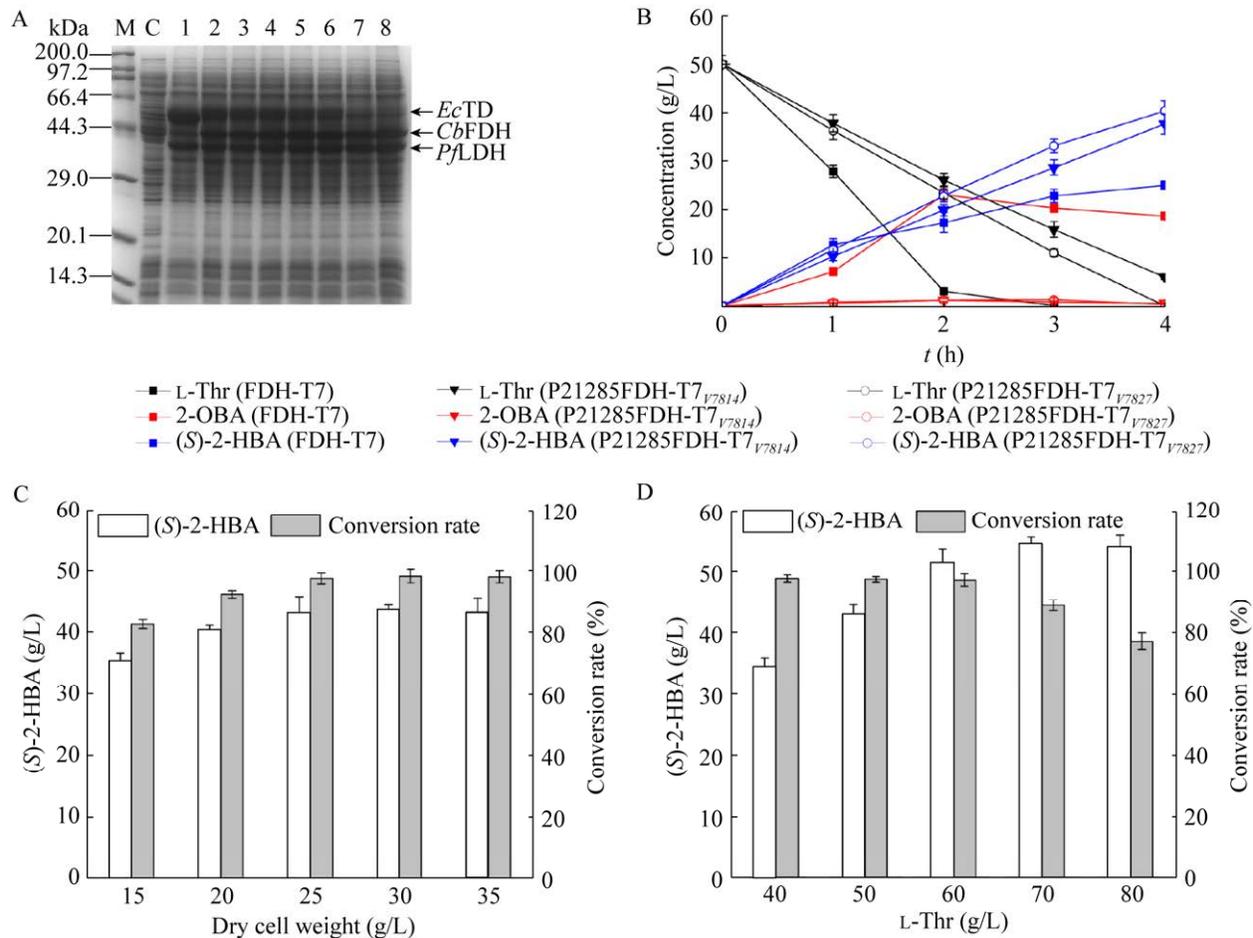


图4 基于启动子优化的多酶协调表达重组菌株的构建及转化条件优化

Fig. 4 Construction of recombinant *E. coli* with multi-enzyme-coordinated expression system based on T7 promoter optimization and optimization of whole cell transformation conditions. (A) SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli*. M: protein marker; C: *E. coli* BL21 pET28a; 1: FDH-T7; 2: P21285FDH-T7<sub>V7839</sub>; 3: P21285FDH-T7<sub>V7835</sub>; 4: P21285FDH-T7<sub>V7832</sub>; 5: P21285FDH-T7<sub>V7827</sub>; 6: P21285FDH-T7<sub>V7814</sub>; 7: P21285FDH-T7<sub>V7802</sub>; 8: P21285FDH-T7<sub>V7797</sub>. (B) Comparison of (S)-2-HBA production of the recombinant FDH-T7, P21285-T7<sub>V7814</sub> and P21285-T7<sub>V7827</sub>. Effect of dry cell weight (C) and concentration of L-Thr (D) on (S)-2-HBA production

表2 重组菌中 *Ec*TD、*Pf*LDH 和 *Cb*FDH 酶活比例

Table 2 The activity of *Ec*TD, *Pf*LDH, *Cb*FDH in recombinant *E. coli* with TD and FDH expressed under promoters of different strength

Strains	Enzyme activity (U/g DCW)			<i>Ec</i> TD : <i>Pf</i> LDH : <i>Cb</i> FDH
	<i>Ec</i> TD	<i>Pf</i> LDH	<i>Cb</i> FDH	
FDH-T7	5 687±63	2 197±23	223±17.0	2.6 : 1.0 : 0.1
P21285FDH-T7 <sub>V7839</sub>	4 924±86	2 345±76	656±16.4	2.1 : 1.0 : 0.28
P21285FDH-T7 <sub>V7835</sub>	4 536±65	2 520±47	752±13.8	1.8 : 1.0 : 0.3
P21285FDH-T7 <sub>V7832</sub>	4 458±76	2 972±52	891±19.6	1.5 : 1.0 : 0.3
P21285FDH-T7 <sub>V7827</sub>	3 432±54	3 120±57	1 092±13.8	1.1 : 1.0 : 0.35
P21285FDH-T7 <sub>V7814</sub>	3 110±46	3 455±42	1 199±14.5	0.9 : 1.0 : 0.35
P21285FDH-T7 <sub>V7802</sub>	1 322±32	2 700±53	1 080±11.4	0.5 : 1.0 : 0.4
P21285FDH-T7 <sub>V7797</sub>	1 196±42	2 989±49	996±16.8	0.4 : 1.0 : 0.35

摩尔转化率为 97.6%，继续增加菌体量，(S)-2-HBA 产量及转化率基本不变。在此基础上，考察不同 L-Thr 浓度对转化效率的影响，如图 4D 所示，当初始 L-Thr 浓度为 60 g/L 时，转化 4 h，L-Thr 的摩尔转化率为 97.5%，随着 L-Thr 浓度增加，(S)-2-HBA 产量少量增加，但摩尔转化率降低。基于此，确定最适菌体添加浓度为 25 g DCW/L，最适初始底物添加量为 60 g/L。

### 2.5 5 L 发酵罐水平重组菌 P21285FDH-T7<sub>V7827</sub> 全细胞转化产 (S)-2-HBA 研究

在 5 L 发酵罐水平，利用重组菌 P21285FDH-T7<sub>V7827</sub> 进行 (S)-2-HBA 的高效合成，维持初始底物浓度为 60 g/L，菌体量为 25 g DCW/L，温度为 30 °C，pH 为 7.5，而且在 4 h、8 h 分别添加底物 L-Thr 60 g/L、50 g/L，进行全细胞转化，结果如图 5 所示。菌株前期合成 (S)-2-HBA 速率较快，能达到约 10.8 g/(L·h)，中间产物 2-OBA 基本没有积累，说明该菌株基本达到了较优的多酶级联催化速率平衡状态，在后期转化过程中，随着酶活力的下降，合成 (S)-2-HBA 的速率也在降低，8–16 h 时仅能保持在约 7 g/(L·h)。最终 16 h 转化结束后，(S)-2-HBA 的产量为 143 g/L，2-OBA 残留量约

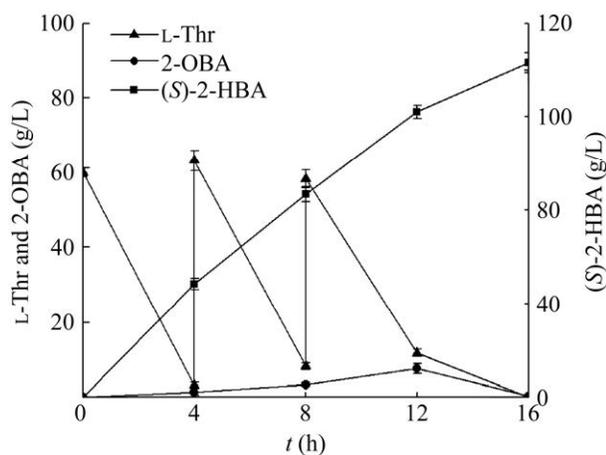


图 5 重组菌 P20285FDH-T7<sub>V7827</sub> 转化 L-Thr 产 (S)-2-HBA

Fig. 5 Biotransformation of L-Thr into (S)-2-HBA by recombinant strain P20285FDH-T7<sub>V7827</sub>.

0.3 g/L，L-Thr 未检测到残留。该菌株对于底物 L-Thr 的转化率达到约 100%，(S)-2-HBA 摩尔产率约 97%。

## 3 结论

本研究成功实现了从大宗化学品 L-Thr 合成光学纯 (S)-2-HBA 的多酶级联催化重组大肠杆菌菌株的构建，并基于启动子工程来调控重组菌中 *EcTD* 和 *CbFDH* 酶的表达水平，有效解决了多酶级联催化反应中速率失配的问题。在 5 L 发酵罐水平，利用 3 种酶 *EcTD*、*PfLDH* 和 *CbFDH* 协同表达的重组菌 P21285FDH-T7<sub>V7827</sub> 进行全细胞转化，转化 16 h 后，(S)-2-HBA 的产量高达 143 g/L，摩尔转化率为 97%，约为迄今报道的最高产量的 1.83 倍。另外，转化体系不需要添加昂贵的辅因子 NADH，使其具有较强的工业化应用潜力。同时，该体系也可应用到其他羟基酸的生物制备过程中。

## REFERENCES

- [1] Park SJ, Lee TW, Lim SC, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxybutyrate from unrelated carbon source by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(1): 273-283.
- [2] Gao C, Zhang W, Lv CJ, et al. Efficient production of 2-oxobutyrate from 2-hydroxybutyrate by using whole cells of *Pseudomonas stutzeri* strain SDM. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(5): 1679-1682.
- [3] Peng H, Gui HY, Zhou QM. A new highly-enantioselective synthetic process for producing (S)-2-hydroxybutyric acid methyl ester. *Wuhan Univ J Nat Sci*, 2015, 20(4): 335-342.
- [4] Araki T, Koura M, Yamazaki Y, et al. Novel synthesis of butyl (S)-2-hydroxybutanoate, the key intermediate of PPAR $\alpha$  agonist (R)-K-13675 from butyl (2S,3R)-epoxybutanoate and butyl (S)-2,3-epoxypropanoate. *Synthesis*, 2013, 45(10): 1319-1324.
- [5] Gao C, Zhang W, Huang YL, et al. Efficient conversion of 1,2-butanediol to (R)-2-hydroxybutyric

- acid using whole cells of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour Technol*, 2012, 115: 75-78.
- [6] Surtees JB, Thomas D, Combert A, et al. Process for the preparation of 2-oxo-1-pyrrolidine derivatives: US, 0009638. 2008-01-10.
- [7] Acton III JJ, Akiyama TE, Chang CH, et al. Correction to discovery of (2*R*)-2-(3-{3-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-2-methyl-6-(trifluoromethoxy)-1*H*-indol-1-yl}phenoxy) butanoic acid (MK-0533): a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  modulator for the treatment of type 2 diabetes mellitus with a reduced potential to increase plasma and extracellular fluid volume. *J Med Chem*, 2013, 56(22): 9368.
- [8] Yamazaki Y, Araki T, Koura M, et al. Enantioselective synthesis of the PPAR $\alpha$  agonist (*R*)-K-13675 via (*S*)-2-hydroxybutyrolactone. *Synthesis*, 2008, 2008(7): 1017-1022.
- [9] Gao C, Zhang W, Ma C Q, et al. Kinetic resolution of 2-hydroxybutanoate racemic mixtures by NAD-independent L-lactate dehydrogenase. *Bioresour Technol*, 2011, 102(7): 4595-4599.
- [10] Kim MJ, Whitesides GM. L-lactate dehydrogenase: substrate specificity and use as a catalyst in the synthesis of homochiral 2-hydroxy acids. *J Am Chem Soc*, 1988, 110(9): 2959-2964.
- [11] Yao PY, Cui YF, Yu SS, et al. Efficient biosynthesis of (*R*)- or (*S*)-2-hydroxybutyrate from L-threonine through a synthetic biology approach. *Adv Synth Catal*, 2016, 358(18): 2923-2928.
- [12] Jiang W, Fang BS. Construction of a tunable multi-enzyme-coordinate expression system for biosynthesis of chiral drug intermediates. *Sci Rep*, 2016, 6: 30462.
- [13] Xu N, Wei L, Liu J. Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35(2): 33.
- [14] Blazeck J, Alper HS. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnol J*, 2013, 8(1): 46-58.
- [15] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12678-12683.
- [16] Komura R, Aoki W, Motone K, et al. High-throughput evaluation of T7 promoter variants using biased randomization and DNA barcoding. *PLoS ONE*, 2018, 13(5): e0196905.
- [17] Wang Y, Liu QT, Weng HJ, et al. Construction of synthetic promoters by assembling the sigma factor binding -35 and -10 boxes. *Biotechnol J*, 2019, 14(1): e1800298.
- [18] Tian LZ, Zhou JP, Yang TW, et al. Cascade biocatalysis for production of enantiopure (*S*)-2-hydroxybutyric acid using recombinant *Escherichia coli* with a tunable multi-enzyme-coordinate expression system. *Syst Microbiol Biomanuf*, 2021. DOI: 10.1007/s43393-020-00021-9.
- [19] Umbarger HE, Brown B. Threonine deamination in *Escherichia coli*. II. Evidence for two L-threonine deaminases. *J Bacteriol*, 1957, 73(1): 105-112.
- [20] Berríos-Rivera SJ, Bennett Gn, San KY. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 217-229.
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [22] Tao RS, Jiang Y, Zhu FY, et al. 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. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(4): 835-841.

(本文责编 郝丽芳)