

· 医药中间体生物合成 ·

刘立明 江南大学教授、博士生导师，教育部长江学者计划特聘教授。主要从事微生物发酵工程的研究与教学工作。主要研究领域为合成生物学和蛋白质工程。作为负责人先后负责国家重点研发计划、国家自然科学基金(重点、优青、面上)项目、江苏省前沿科技引领等国家或省部级项目 20 余项。在 *Nature Catalysis*、*Nature Communications*、*Chemical Reviews*、*Metabolic Engineering*、*Green Chemistry*、《微生物学报》《生物工程学报》等国内外生物工程类主流学术期刊上发表学术论文 260 余篇，其中 SCI 论文 190 余篇(最高 IF=70)、授权发明专利 70 余项、出版科技著作 4 部。主要研究成果包括国家技术发明二等奖(第三)、教育部科技进步一等奖(第一)、江苏省自然科学一等奖(第三)、中国石油与化学工业技术发明一等奖(第二)等。



双酶级联催化 L-色氨酸合成靛蓝

罗诗琪¹，魏婉清²，吴静²，宋伟²，胡贵鹏²，刘立明^{1,3*}

1 安徽科技学院 食品工程学院，安徽 凤阳 233100

2 江南大学 生命科学与健康工程学院，江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122

罗诗琪, 魏婉清, 吴静, 宋伟, 胡贵鹏, 刘立明. 双酶级联催化 L-色氨酸合成靛蓝[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2444-2456.
LUO Shiqi, WEI Wanqing, WU Jing, SONG Wei, HU Guipeng, LIU Liming. A dual-enzyme cascade for production of indigo from L-tryptophan[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2444-2456.

摘要: 靛蓝(indigo)作为一种水溶性非偶氮类着色剂, 广泛应用于纺织、食品、制药等工业领域。目前靛蓝主要采用化学法合成, 存在环境污染、安全隐患等问题, 亟须寻找更安全、更绿色的合成方法。本研究利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源的色氨酸酶(tryptophanase, *EcTnaA*)和噬甲基菌(*Methylophaga aminisulfidivorans*)来源的黄素依赖性单加氧酶(flavin-dependent monooxygenase, *MaFMO*)构建双酶级联路径, 以 L-色氨酸为底物合成靛蓝, 导入 *E. coli* 中获得重组菌株 *EM-IND01*。通过对限速酶 *MaFMO* 进行蛋白质工程改造, 获得了有益突变体 *MaFMO*^{D197E}, 比酶活和 k_{cat}/K_m 比野生型分别提高了 2.36 倍和 1.34 倍; 将其引入菌株 *EM-IND01* 中获得重组菌株 *EM-IND02*, 并进行发酵条件优化, 在 5 L 发酵罐中靛蓝产量为(1 288.59±7.50) mg/L, 转化率为 0.86 mg/mg L-色氨酸, 生产强度为 26.85 mg/(L·h)。本研究通过蛋白质工程改造, 获得 *MaFMO* 活性提高的突变体, 为靛蓝的工业化生产奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌; 靛蓝; 蛋白质工程改造; 双酶级联; L-色氨酸

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102700); 轻工业技术与工程国家一级学科计划(QJGC20230101)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102700) and the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (QJGC20230101).

*Corresponding author. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-02-01; Accepted: 2024-03-20; Published online: 2024-05-23

A dual-enzyme cascade for production of indigo from L-tryptophan

LUO Shiqi¹, WEI Wanqing², WU Jing², SONG Wei², HU Guipeng², LIU Liming^{1,3*}

1 School of Food Engineering, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China

2 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

Abstract: Indigo, as a water-soluble non-azo colorant, is widely used in textile, food, pharmaceutical and other industrial fields. Currently, indigo is primarily synthesized by chemical methods, which causes environmental pollution, potential safety hazards, and other issues. Therefore, there is an urgent need to find a safer and greener synthetic method. In this study, a dual-enzyme cascade pathway was constructed with the tryptophan synthase (tryptophanase, *EcTnaA*) from *Escherichia coli* and flavin-dependent monooxygenase (flavin-dependent monooxygenase, *MaFMO*) from *Methylophaga aminisulfidivorans* to synthesize indigo with L-tryptophan as substrate. A recombinant strain *EM-IND01* was obtained. The beneficial mutant *MaFMO*^{D197E} was obtained by protein engineering of the rate-limiting enzyme *MaFMO*. *MaFMO*^{D197E} showed the specific activity and k_{cat}/K_m value 2.36 times and 1.34 times higher than that of the wild type, respectively. Furthermore, *MaFMO*^{D197E} was introduced into the strain *EM-IND01* to construct the strain *EM-IND02*. After the fermentation conditions were optimized, the strain achieved the indigo titer of (1 288.59±7.50) mg/L, the yield of 0.86 mg/mg L-tryptophan, and the productivity of 26.85 mg/(L·h) in a 5 L fermenter. Protein engineering was used to obtain mutants with increased *MaFMO* activity in this study, which laid a foundation for industrial production of indigo.

Keywords: *Escherichia coli*; indigo; protein engineering; dual-enzyme cascade; L-tryptophan

靛蓝作为一种水溶性非偶氮类着色剂,是最常见、最古老的染料之一,广泛应用于纺织品染色^[1-5]、食品、制药^[6-13]、化学传感器^[14-15]和半导体材料^[16-17]等领域。目前全球对靛蓝的年需求量超过 8 万 t,主要来源于:(1) 化学合成。苯基甘氨酸在氨基钠的存在下与 NaOH 和 KOH 融合,然后氧化生成靛蓝,收率为 80%–83%;(2) 植物提取。从蓼科植物、龙葵科植物和菜豆科植物提取靛青或者靛苷^[18]。化学工艺因大量使用有机溶剂和强碱,会造成严重的环境危害;而提取工艺因野生资源有限加上提取工艺复

杂,限制了植物靛蓝的发展^[19]。生物法因绿色、高效、环保等优点逐渐成为靛蓝生产的最有前途的方法^[20-21]。能催化合成靛蓝的酶^[22]有非血红素铁加氧酶^[23]、含血红素加氧酶^[24-25]和黄素依赖性单加氧酶(flavin-dependent monooxygenase, FMO)^[26]。其中,非血红素铁加氧酶代表是萘双加氧酶(naphthalene dioxygenase, NDO),如来源于假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) J26 菌株的 NDO 在 20 h 内能够从 2.5 mmol/L 吲哚中生成 138.1 μmol/L 靛蓝^[27]。含血红素加氧酶中能够羟基化吲哚的一个是依赖于氧化还原伴侣和昂贵辅因子的

P450 酶^[28-30], 如来源于巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的 P450BM3 与葡萄糖脱氢酶的共表达使 5 mmol/L 吡啶产生了 2.9 mmol/L 的靛蓝; 另一个是依赖于 H₂O₂ 作为氧供体和电子受体的非特异性过氧合酶(unspecific peroxygenases, UPO), 能将一系列吡啶及其衍生物转化为相应的靛蓝或靛蓝衍生物^[31]。黄素单加氧酶以 NADPH 为辅因子将色氨酸酶(tryptophanase)的 N 端和黄素单加氧酶的 C 端进行融合表达, 能够将 2 g/L 的 L-色氨酸完全转化为 1.7 g/L 靛蓝^[32], 这也是目前报道生物合成靛蓝产量最高的酶。尽管已有不同来源的酶能够催化吡啶生成靛蓝, 但路径中关键限速酶活性低和中间体吡啶毒性问题限制着靛蓝的工业规模生产。

为此, 本研究通过将来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)的色氨酸酶(tryptophanase, *EcTnaA*)和来源于 *Methylophaga aminisulfidivorans* 的黄素依赖性单加氧酶(flavin-dependent monooxygenase, *MaFMO*)整合到 *E. coli* 中, 构建 L-色氨酸生成靛蓝的双酶级联路径, 减少中间体吡啶的大量积累。通过对限速酶 *MaFMO* 进行蛋白质工程改造以提高酶活并对发酵条件进行优化。

表 1 本研究所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> MG1655 (K12)	Used to extract <i>EcTnaA</i>	Lab store
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression host	Lab store
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- <i>EcTnaA</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) containing pET28a- <i>EcTnaA</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- <i>MaFMO</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) containing pET28a- <i>MaFMO</i>	This study
<i>E. coli</i> EM-IND01 (BL21- <i>EcTnaA</i> - <i>MaFMO</i>)	<i>E. coli</i> BL21(DE3) containing pET28a- <i>EcTnaA</i> - <i>MaFMO</i>	This study
<i>E. coli</i> EM-IND02 (BL21- <i>EcTnaA</i> - <i>MaFMO</i> ^{D197E})	<i>E. coli</i> BL21(DE3) containing pET28a- <i>EcTnaA</i> - <i>MaFMO</i> ^{D197E}	This study
Plasmids		
pET28a- <i>EcTnaA</i>	Kan ^R , His tag, T ₇ promoter	This study
pET28a- <i>EcTnaA</i>	Kan ^R , His tag, T ₇ promoter	This study
pET28a- <i>EcTnaA</i> - <i>MaFMO</i>	Kan ^R , His tag, T ₇ promoter	This study

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒和引物

实验所用重组菌株及引物见表 1、表 2。

1.1.2 主要仪器和试剂

分子生物学工具酶、SDS-PAGE Protein Marker、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒等分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司; L-色氨酸、吡啶、靛蓝等标品购自阿拉丁生化科技股份有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖(isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG)、硫酸卡那霉素(kanamycin, Kan)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 供实验所用试剂盒、一步同源重组酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成; 其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。5 L 全自动发酵罐购自迪比尔生物工程(上海)有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10 (固体培养基加入 2%琼脂粉)。

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>EcTnaA</i> -F	TAACITTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAT	50
<i>EcTnaA</i> -R	CCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAGC	50
<i>MaFMO</i> -F	GGATCCGCGACCCATTTGCTGTCCA	25
<i>MaFMO</i> -R	AAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACC	25
<i>MaFMO</i> -D197X-F	GCGCTGGAATTTAAANNKAAAACAGTATTATTAGTCGGCAGCTCG	45
<i>MaFMO</i> -D197X-R	AATAATACTGTTTTMNNTTTAAATTCAGCGCATCGCGG	39

发酵培养基(g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10, L-色氨酸 1.5。

TB 培养基(g/L): 甘油 4, 胰蛋白胨 12, 酵母粉 24, KH_2PO_4 2.31, K_2HPO_4 12.54, 用于重组菌株全细胞培养。

1.2 方法

1.2.1 重组菌株构建

表达质粒的构建采用标准分子克隆操作和吉布森组装法, 其中一步同源重组法是根据目的片段与表达载体之间具有相同序列连接的方法。来源于 *Methylophaga aminisulfidivorans* 的 *FMO* 基因在天霖生物科技无锡有限公司进行密码子优化和合成。以基因组 *E. coli* MG1655 为模板, 用引物对 *EcTnaA*-F 和 *EcTnaA*-R 扩增 *EcTnaA*, 并以引物对 *MaFMO*-F 和 *MaFMO*-R 剪切 pET-28a-*MaFMO* 质粒, 最后将扩增得到的 *EcTnaA* 片段和剪切的 pET-28a-*MaFMO* 质粒经同源重组连接获得重组质粒 pET28a-*EcTnaA*-*MaFMO*, 将构建完成的质粒导入 *E. coli* BL21(DE3)后获得重组菌株 EM-IND01。

1.2.2 培养方法

平板活化: 蘸取保藏于甘油管中的菌液, 在 LB 固体平板上进行三区划线, 37 °C 恒温培养 12 h。

种子培养: 挑取三区划线的单菌落移入装有含 2 mmol/L 硫酸卡那霉素的 50 mL LB 培养基的三角瓶中, 在 pH 为 7.0 的条件下 37 °C、220 r/min 培养 8 h 后再传代一次。

摇瓶发酵: 在发酵培养基中加入 2 mmol/L 硫酸卡那霉素, 以 1% 接种量将种子培养液接种于装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 在 pH 为 7.0 的条件下 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 2.5, 后转为 30 °C 培养 45 h。

发酵罐发酵: 采用 5 L 全自动搅拌发酵罐进行发酵, 发酵初始装液量为 2 L, 加入 2 mmol/L 硫酸卡那霉素, 并将种子液以 1% (体积分数) 接种量接种至发酵培养基中, 发酵温度初始为 37 °C, 培养至 OD_{600} 为 2.5 后转为 30 °C 发酵。维持初始转速 220 r/min, 通入 100% 无菌干燥空气进行发酵, 过程中通过调整搅拌转速及通气速率维持溶解氧浓度为 30%–40%, 通过流加 33.3% 浓度的盐酸将 pH 维持在 7.0–7.5 之间, 发酵至 48 h 结束。

全细胞培养方法: 在 TB 培养基中加入 2 mmol/L 硫酸卡那霉素, 以 2% 接种量将种子培养液接种于装有 150 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 在 37 °C、220 r/min 条件下培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 添加 2 mmol/L IPTG 诱导剂后转为 16 °C 培养 18 h。

1.2.3 酶活测定

EcTnaA 比酶活测定方法: 1 mL 反应体系包含 1 mmol/L L-色氨酸、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 及 10 $\mu\text{mol/L}$ *EcTnaA* 纯酶。在 30 °C 下反应 30 min 后用 HPLC 检测吲哚的生成量, 计算酶活。催化反应温度控制在 30 °C, 每

分钟生成 1 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚所需的酶量为 1 个酶活力单位。

MaFMO 比酶活测定方法：1 mL 反应体系包含 1 mmol/L 吲哚、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 9.0)、1 mmol/L NADPH 及 10 $\mu\text{mol/L}$ *MaFMO* 纯酶。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min 后用 HPLC 检测靛蓝的生成量，计算酶活。催化反应温度控制在 30 $^{\circ}\text{C}$ ，每分钟生成 1 $\mu\text{mol/L}$ 的靛蓝所需酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.4 动力学参数测定

EcTnaA 动力学参数测定方法：1 mL 反应体系包含 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4)、10 $\mu\text{mol/L}$ *EcTnaA* 纯酶和浓度分别为 0.5、1、2、5、7、10、15、20 mmol/L 的 L-色氨酸。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min 后用 HPLC 检测吲哚的生成量。使用 Origin 2021 软件进行非线性曲线拟合。

MaFMO 动力学参数测定方法：1 mL 反应体系包含 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 9.0)、10 $\mu\text{mol/L}$ *MaFMO* 纯酶、1 mmol/L NADPH 和浓度分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L 的吲哚，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min 后用 HPLC 检测靛蓝生成量。使用 Origin 2021 软件进行非线性曲线拟合。

1.2.5 分析检测方法

细胞浓度检测：取细胞培养液，稀释至 OD_{600} 在 0.2–0.8 之间，通过紫外分光光度计检测其在波长 600 nm 处的吸光度。

L-色氨酸浓度检测：具体方法参照已报道的研究^[33]。

吲哚浓度检测：使用 Agilent C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Agilent)。流动相配比为水与甲醇按 3:7 (体积比) 混合；紫外检测器检测波长为 260 nm；进样量 10 μL ；流速 0.5 mL/min；柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

靛蓝浓度检测：使用 Agilent C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Agilent)。流动相配比为水与甲醇按 3:7 (体积比) 混合；紫外检测器检测波长为 620 nm；进样量 10 μL ；流速 0.5 mL/min；柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 L-色氨酸合成靛蓝的级联路径设计和体外构建

从 L-色氨酸出发合成靛蓝的生物催化路径如图 1 所示。首先，色氨酸酶 (TnaA, EC 4.1.99.1) 将 L-色氨酸分解产生吲哚、丙酮酸和氨；所生成的吲哚再经氧化酶 (FMO, EC1.14.13.8) 氧化生成 3-羟基吲哚，接着 3-羟基吲哚发生自发的烯醇酮式互变异构为 3-吲哚酮，最后 2 分子的 3-吲哚酮发生氧化缩合生成靛蓝并释放 1 分子水。

由于 *E. coli* 来源的 TnaA 具有优异的催化活性，因此我们选择其催化 L-色氨酸分解产生吲哚、丙酮酸和氨^[34]。能够催化吲哚氧化生成 3-羟基吲哚的酶如表 3 所示，其中来源于炭团菌 (*Hypoxylon*

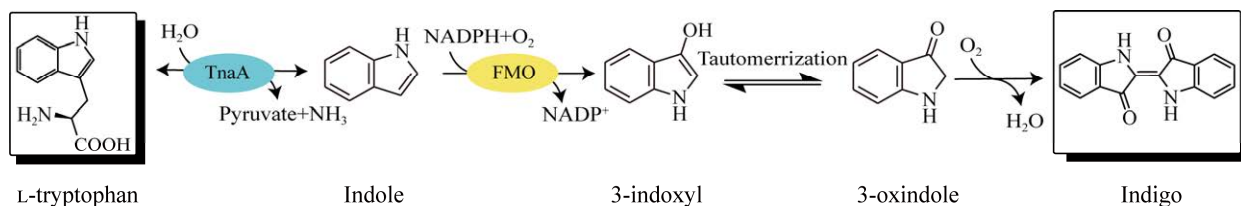


图 1 双酶级联催化 L-色氨酸合成靛蓝路径

Figure 1 Dual-enzyme cascade pathway for synthesis of indigo from L-tryptophan.

表 3 不同来源吲哚羟化酶的性质比较

Table 3 Comparison of properties of different indole hydroxylases

Enzymes	Organism	Oxygen source	Cofactor	k_{cat}/K_m (L/(mmol·min))	Yield (mg/L)	Conversion (%)	References
<i>HspUPOs</i>	<i>Hypoxylon</i> sp. EC38	H ₂ O ₂	–	900.00	51.00	98.00	[35]
FMO	<i>Methylophaga aminisulfidivorans</i>	O ₂	NADPH/FAD	–	1 700.00	85.00	[32]
Ngb ^{A15C/H64D/F49Y}	Human	H ₂ O ₂	–	42.84	215.05	82.00	[25]
P450 BM3 ^{F87A}	<i>Bacillus megaterium</i>	H ₂ O ₂	NADPH	–	760.60	68.50	[24]
NDO	<i>Comamonas</i> sp. MQ	O ₂	–	–	205.00	68.30	[23]
Nb ^{F43Y/H64D}	Sperm whale	H ₂ O ₂	–	6.60	47.21	54.00	[36]
Indole oxygenase	<i>Cupriavidus</i> sp. SHE	O ₂	NADH/FAD	–	307.00	30.70	[37]
FMO ^{M185L/V402A}	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	O ₂	NADPH/FAD	36.36	800.00	40.00	[38]
XiaI	<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 02999	H ₂ O ₂	–	–	26.00	–	[39]
P450 _{cam} ^{F87W/Y96F}	<i>Pseudomonas putida</i>	O ₂	NADH	–	20.00	–	[40]

sp.) EC38 的非特异性过加氧酶(*Hypoxylon* sp. EC38 unspecific peroxygenases, *HspUPO*)转化率最高, 为 98%, 但是以 H₂O₂ 作为氧源的耐受性导致吲哚羟基化产物的收率仅为 51 mg/L^[35]; 而来源于 *Methylophaga aminisulfidivorans* 的黄素依赖性单加氧酶(*MaFMO*)对吲哚的羟基化产物转化率为 85%, 产量最高达到 1 700 mg/L^[32], 因此选择 *MaFMO* 催化吲哚生成 3-羟基吲哚。

为了验证上述路径的可行性, 将 *EcTnaA* 和 *MaFMO* 于 *E. coli* BL21(DE3)中进行过表达, 破碎细胞并纯化得到纯酶。将重组蛋白以不同的摩尔比添加在含有 1 mmol/L L-色氨酸和 1 mmol/L NADPH 的 1 mL 反应体系中, 在 30 °C 摇床中反应 30 min。最终生成的蓝色沉淀物质, 经 DMSO 萃取后采用 HPLC 和液相色谱质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 鉴定靛蓝的生成(图 2A), 通过与靛蓝标准品的 m/z 对比, 可以证明蓝色沉淀物质为目标产物靛蓝(图 2B)。当两种酶的摩尔比为 1:1 (均为 10 μmol/L)时, 靛蓝的生产速率为 3.01 mg/(L·min)。固定 *EcTnaA* 的摩尔添加量不

变, 将 *MaFMO* 的摩尔量增加 1–3 倍, 生产速率相比于摩尔比为 1:1 时分别提高了 1.07、1.25、1.34 倍; 固定 *MaFMO* 摩尔量不变, 将 *EcTnaA* 摩尔量增加 1–3 倍, 生产速率相比于 1:1 时分别提高了 1.01、1.03、1.09 倍(图 2C)。通过比较反应速率的提升倍数, 可以看出 *MaFMO* 是级联反应的关键限速酶。

2.2 靛蓝生物合成体内路径构建

将 *EcTnaA* 和 *MaFMO* 基因克隆至 pET-28a(+) 质粒, 然后转化到 *E. coli* BL21(DE3)菌株中, 得到菌株 *EM-IND01* (图 3A)。通过全细胞蛋白电泳考察重组大肠杆菌的蛋白表达情况, 验证目标蛋白是否能够正常表达。SDS-PAGE 胶染色后可清晰地观察到两条蛋白条带, 与 *EcTnaA* (53 kDa)和 *MaFMO* (55 kDa)分子量大小相符(图 3B), 说明 *EcTnaA* 和 *MaFMO* 在菌株 *EM-IND01* 中均实现了可溶性表达。

为了验证菌株 *EM-IND01* 能否将 L-色氨酸转化生成靛蓝, 在 100 mL LB 培养基中研究不同 L-色氨酸浓度的转化效率, 结果如图 3C 所示。当 L-色氨酸浓度从 0.5 g/L 增加到 2.0 g/L

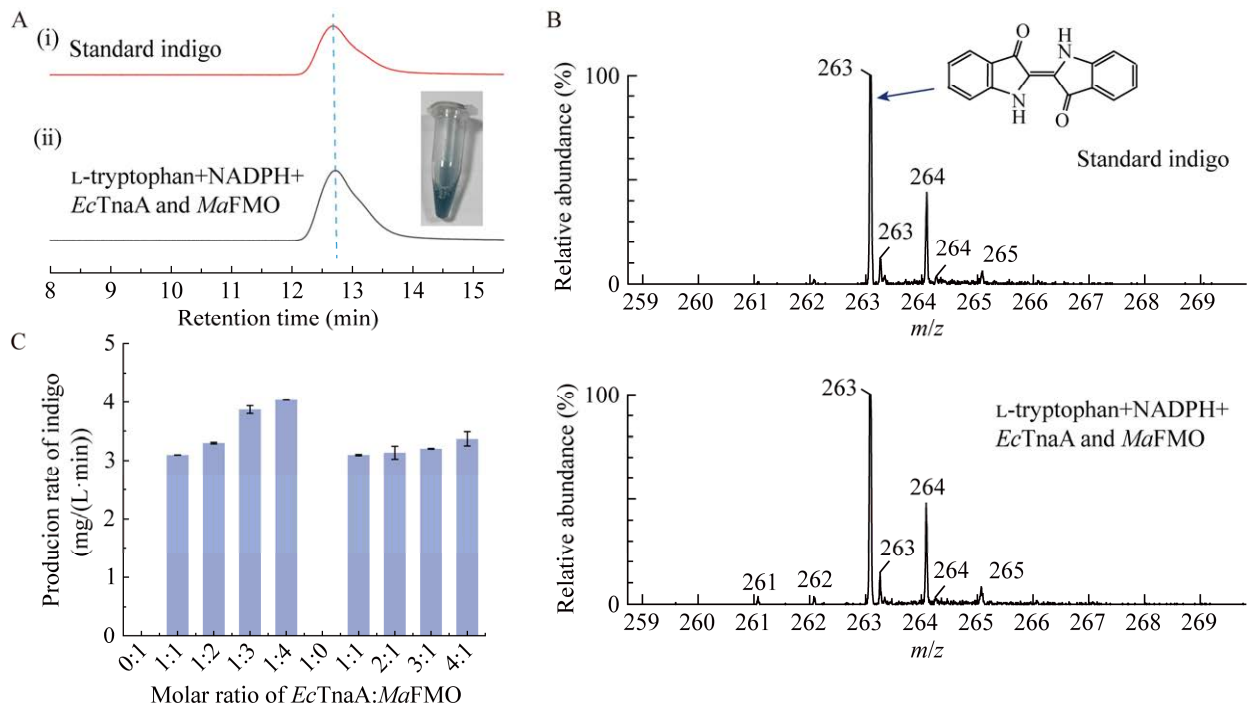


图2 级联路径的体外构建与验证 A: 使用 HPLC 验证产物靛蓝的生成. B: 使用 LC-MS 验证产物靛蓝的生成. C: 双酶添加摩尔比对靛蓝生产速率的影响

Figure 2 Construction and validation of cascade pathway *in vitro*. A: Analysis of the indigo with HPLC. B: Analysis of the products indigo with LC-MS. C: The effect of molar ratio of double enzyme addition on the synthesis rate of indigo.

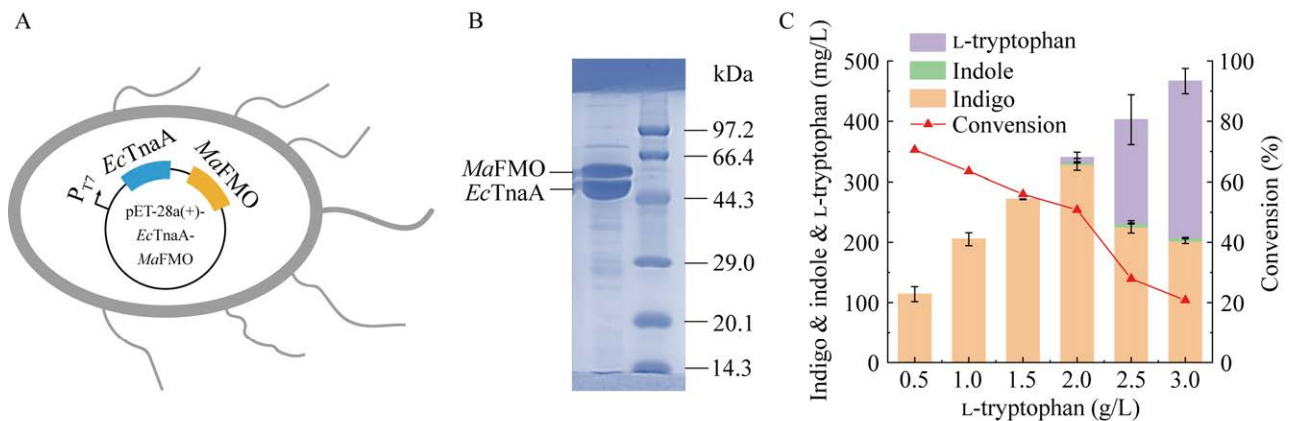


图3 建高产靛蓝的菌株 *EM-IND01* A: *EM-IND01* 质粒的构建. B: 来自菌株 *EM-IND01* 细胞提取物的 SDS-PAGE 分析图. C: 不同 L-色氨酸浓度对菌株 *EM-IND01* 转化生产靛蓝的影响. 所有结果均为 3 次平行实验结果的平均值

Figure 3 Constructing a high-yield indigo producing strain *EM-IND01*. A: Construction of the plasmid used for *EM-IND01*. B: The SDS-PAGE analysis of the *EM-IND01* strain from cell-free extracts. C: Influence of different substrate concentrations on indigo production by the *EM-IND01* strain. All the results are the average of three parallel experimental results.

时, 靛蓝产量从(114.10±12.49) mg/L 增加至(328.59±9.68) mg/L, 转化率从(70.54±8.00)% 下降至(50.79±1.55)%; 然而, 当 L-色氨酸浓度从 2.0 g/L 增加至 3.0 g/L 时, 靛蓝产量从(328.59±9.68) mg/L 降低至(201.99±3.92) mg/L, 同时转化率进一步降至(20.81±0.42)%。其原因可能是中间体吲哚的积累, 当 L-色氨酸浓度为 3.0 g/L 时, 吲哚积累量为(6.33±0.02) mg/L。此时, 转化液中含有(258.23±20.90) mg/L 的 L-色氨酸, 表明高底物浓度会抑制反应的进行。有研究表明吲哚浓度超过 5 mmol/L 就会抑制 TnaA 活性和 L-色氨酸转运过程^[41]。菌株 EM-IND01 中 *EcTnaA* 和 *MaFMO* 的比酶活分别为(1.61±0.19) U/g 和(1.41±0.13) U/g, 两者之间比值为 1.14:1, *EcTnaA* 和 *MaFMO* 的 k_{cat}/K_m 为(0.91±0.16) L/(mmol·s)和(0.82±0.22) L/(mmol·s), 比值约为 1.11:1 (表 4)。上述结果同样证明了 *MaFMO* 是 L-色氨酸转化生成靛蓝的关键限速酶。

2.3 蛋白质工程改造 *MaFMO*

为了能够从大量的突变体文库中快速筛选出活性提高的 *MaFMO* 突变体, 基于靛蓝在 620 nm 波长处具有吸收峰且存在显色反应构建了一个高通量筛选方法(图 4): 具有 *MaFMO* 活性的菌

株在 LB 固体平板上的菌落显蓝色。于是, 将突变文库转化至 BL21 菌株中, 涂布于 LB 固体平板, 从平板上挑取已显色的菌落, 接种于含有 LB 液体培养基的 96 孔板中于 37 °C 培养 24 h 后, 将 96 孔板离心, 获得靛蓝沉淀, 然后用等体积的 DMSO 溶解, 于 620 nm 波长处进行初筛。最后, 在 100 mL LB 培养基中添加 1.5 g/L 的 L-色氨酸培养 48 h, 使用 HPLC 对阳性菌株进行复筛, 就能够快速且准确地筛选出活性高于野生型的 *MaFMO* 突变体。

以野生型 pET28a-*EcTnaA*-*MaFMO* 质粒为模板, 使用高通量筛选方法进行突变。通过序列比对, 去除非保守氨基酸后对底物通道和底物结合腔周围 5 Å 范围内的氨基酸残基(W400、K401、K404、C78、D317、Q318、W319、Y320)以及 NADPH 结合域的氨基酸残基(K196、D197、K198、T199、A221、K222、K223)进行 NNK 定点饱和和突变, 最终获得一个有益突变体 D197E。突变体 *MaFMO*^{D197E} 的比酶活和 k_{cat}/K_m 值分别是野生型的 2.36 倍和 1.34 倍(表 4)。将菌株 EM-IND01 中的 *MaFMO* 替换成突变体 *MaFMO*^{D197E}, 获得菌株 EM-IND02。菌株 EM-IND02 能催化 1.5 g/L L-色氨酸生成(540.44±3.44) mg/L 靛蓝, 转化率为(49.6±0.32)%; 野生型产量为(495.83±3.89) mg/L, 转化率为(45.49±0.36)%, 突变体 *MaFMO*^{D197E} 较野生型产量提高了 44.63 mg/L, 转化率提高了野生型的 9.00%。

2.4 双酶级联一锅法生产靛蓝

为了进一步提升靛蓝产量, 在 1.2.2 摇瓶发酵的操作基础上对菌株 EM-IND02 的发酵温度(16、23、30、37 °C)、种子液 OD_{600} (1.5、2.0、2.5、2.7)、反应液 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0) 和诱导剂 IPTG 的浓度(0.0、0.2、0.4、0.6 mmol/L) 进行分批优化。首先, 当摇瓶发酵种子液 OD_{600} 为 2.0, 反应液 pH 为 7.5, 添加 0.2 mmol/L IPTG

表 4 *EcTnaA*、*MaFMO* 和 *MaFMO*^{D197E} 比酶活及动力学参数

Table 4 Specific enzyme activity and kinetic parameters by *EcTnaA*, *MaFMO* and *MaFMO*^{D197E}

Ezymes	Specific enzyme activity (U/g)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
<i>EcTnaA</i>	1.61±0.19	0.83±0.12	0.67±0.02	0.91±0.16
<i>MaFMO</i>	1.41±0.13	0.84±0.04	0.69±0.21	0.82±0.22
<i>MaFMO</i> ^{D197E}	3.33±0.54	1.03±0.02	1.14±0.47	1.10±0.44

U: The amount of enzyme required to produce 1 μ mol product per minute. All the tests were performed twice.

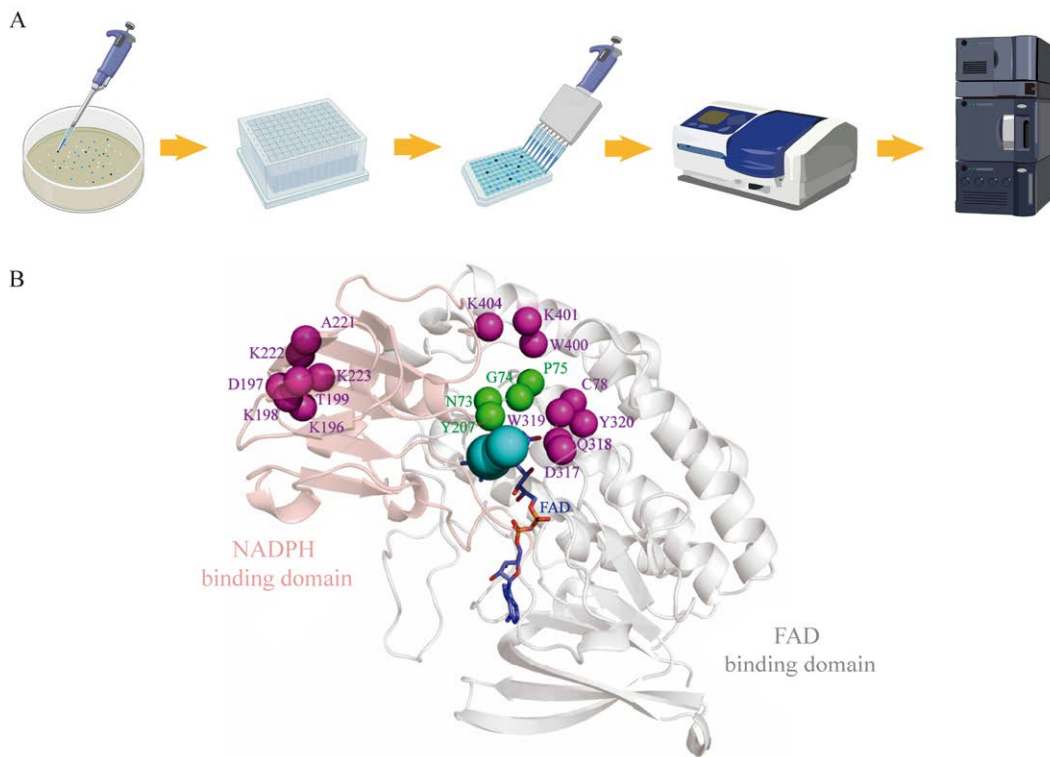


图 4 *MaFMO* 的蛋白质工程改造 A: 靛蓝的高通量筛选方法示意图. B: 突变位点展示图. 粉色模型表示 NADPH 结合域; 灰色模型表示 FAD 结合域; 玫红色球体表示通过序列比对后剩余的突变位点; 绿色球体表示的 Y207、N73、G74、P75 氨基酸和玫红色球体表示的 C78、D317、Q318、W319、Y320 氨基酸构成活性口袋; 浅蓝色球体表示底物通道; 深蓝色球棍模型表示辅因子 FAD

Figure 4 Protein engineering modifications of *MaFMO*. A: Schematic diagram of high-throughput screening method for indigo. B: Display of mutation sites. The pink model represents the NADPH binding domain; the gray model represents the FAD binding domain; the magenta spheres represent the remaining mutation sites identified through sequence alignment; the green spheres represent the amino acids Y207, N73, G74, P75, and the magenta spheres represent the amino acids C78, D317, Q318, W319, Y320, which form the active pocket; the light blue spheres represent the substrate channel; the dark blue sphere and stick model represent the cofactor FAD.

时, 考察不同发酵温度对菌株 *EM-IND02* 生产靛蓝的影响, 结果如图 5A 所示, 当反应温度为 30 °C 时可以获得 (572.77 ± 26.67) mg/L 靛蓝。在此基础上对种子液 OD_{600} 进行优化, 结果如图 5B 所示, 当种子液 OD_{600} 为 2.5 时靛蓝产量进一步提高到 (637.24 ± 7.48) mg/L。然后对反应液 pH 进行优化, 结果如图 5C 所示, 当反应液 pH 为 7.0 时靛蓝产量再次提高到 (710.15 ± 2.09) mg/L。

最后对诱导剂 IPTG 浓度进行了优化, 结果如图 5D 所示, 未添加 IPTG 时, 靛蓝产量提升至 (939.01 ± 19.50) mg/L, 此时转化率为 72.60%。为了进一步考察菌株 *EM-IND02* 的工业化应用水平, 在 5 L 发酵罐中进行实验。结果如图 5E 所示, 反应 48 h 后, 靛蓝产量为 $(1\ 288.59 \pm 7.50)$ mg/L, 产率为 0.86 mg/mg 色氨酸, 生产强度为 26.85 mg/(L·h)。

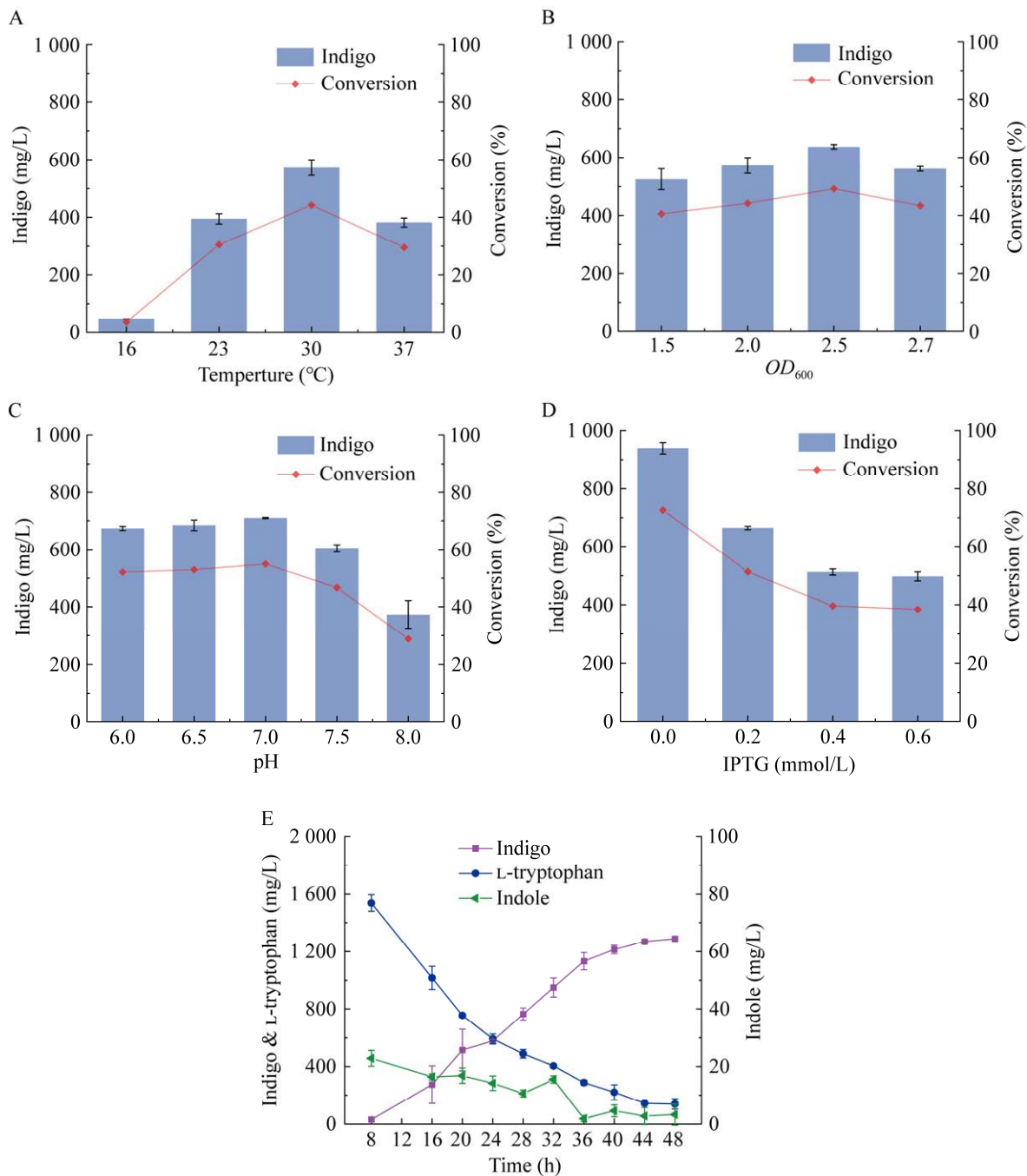


图5 菌株 *EM-IND02* 转化生产靛蓝的条件优化 A: 不同反应温度对靛蓝产量的影响. B: 不同 OD_{600} 值对靛蓝产量的影响. C: 不同初始 pH 对靛蓝产量的影响. D: 不同 IPTG 浓度对靛蓝产量的影响. E: 菌株 *EM-IND02* 在 5 L 发酵罐中转化 L-色氨酸生产靛蓝

Figure 5 Optimization of indigo production conditions with strain *EM-IND02*. A: Effect of temperature on indigo concentration. B: Effect of OD_{600} on indigo concentration. C: Effect of buffer pH on indigo concentration. D: Effect of IPTG concentration on indigo concentration. E: Conversion L-tryptophan production indigo experiments of *EM-IND02* strain at 5 L fermentation vessel.

3 讨论与结论

在以 L-色氨酸为底物合成靛蓝的级联路径中, 限速酶的存在限制了产物靛蓝的高效合成。为了提升限速酶的活性, 将限速酶进行蛋白质工程改造是一个有潜力的策略, 如对 *Methylophaga* sp. 来源的 mFMO 的活性空腔进行饱和突变, 得到突变体 C78I 的 k_{cat} 虽然比野生型提升了 1.5 倍, 但 k_{cat}/K_m 反而降低了 24.70%, 最终靛蓝产量仅为 300.00 mg/L^[26]。本研究对限速酶 MaFMO 进行了定点饱和突变, 以进一步提高限速酶 MaFMO 活性。与野生型相比, 有益突变体 D197E 的 k_{cat} 提升了 1.65 倍, k_{cat}/K_m 提高了 1.34 倍, 最终靛蓝产量提高到(1 288.59±7.50) mg/L。

除了提升限速酶活性外, 还可通过消除中间体吲哚的积累来增加靛蓝产量。已有文献报道超过 5 mmol/L 吲哚就会抑制 TnaA 活性和 L-色氨酸转运过程^[41], 从而影响级联路径的合成效率。但若以吲哚为底物合成靛蓝, 这会限制靛蓝的大批量合成。因此可通过调控酶表达水平来控制中间体的积累。本研究将 *EcTnaA* 和 MaFMO 构建到同一菌株中进行过表达, 提高了 *EcTnaA* 的表达和稳定性, 从而提高靛蓝产量。

目前, 本研究主要集中在对限速酶的改造以及发酵条件的优化, 从而提升反应效率。为了进一步提高整体路径的合成效率, 在后续研究中将路径中间体吲哚的积累进行优化, 进而减少对路径酶 *EcTnaA* 的限制, 提升整体路径的转化效率。此外, 为了实现更低成本的生产, 还可从葡萄糖出发, 将葡萄糖发酵生成 L-色氨酸, 然后级联 *EcTnaA* 和 MaFMO, 实现以葡萄糖为底物大量合成靛蓝。

REFERENCES

- [1] VÁZQUEZ-ORTEGA F, LAGUNES I, TRIGOS Á. Cosmetic dyes as potential photosensitizers of singlet oxygen generation[J]. *Dyes and Pigments*, 2020, 176: 108248.
- [2] SADAUSKAS M, STATKEVIČIŪTĖ R, VAITEKŪNAS J, PETKEVIČIUS V, ČASAITĖ V, GASPARAVIČIŪTĖ R, MEŠKYS R. Enzymatic synthesis of novel water-soluble indigoid compounds[J]. *Dyes and Pigments*, 2020, 173: 107882.
- [3] SAIKHAO L, SETTHAYANOND J, KARPKIRD T, BECHTOLD T, SUWANRUJI P. Green reducing agents for indigo dyeing on cotton fabrics[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 197: 106-113.
- [4] COSTA AFDS, de AMORIM JDP, ALMEIDA FCG, de LIMA ID, de PAIVA SC, ROCHA MAV, VINHAS GM, SARUBBO LA. Dyeing of bacterial cellulose films using plant-based natural dyes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 580-587.
- [5] 徐枫, 姜利利, 王永华, 王祥荣. 靛蓝染料染色技术研究进展[J]. *印染助剂*, 2023, 40(5): 1-6.
XU F, JIANG LL, WANG YH, WANG XR. Research progress of indigo dyeing technology[J]. *Textile Auxiliaries*, 2023, 40(5): 1-6 (in Chinese).
- [6] PULIT-PROCIAK J, CHWASTOWSKI J, KUCHARSKI A, BANACH M. Functionalization of textiles with silver and zinc oxide nanoparticles[J]. *Applied Surface Science*, 2016, 385: 543-553.
- [7] HEO BG, PARK YJ, PARK YS, BAE JH, CHO JY, PARK K, JASTRZEBSKI Z, GORINSTEIN S. Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant[J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 56: 9-16.
- [8] YOU WC, HSIEH CC, HUANG JT. Effect of extracts from indigowood root (*Isatis indigotica* Fort.) on immune responses in radiation-induced mucositis[J]. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2009, 15(7): 771-778.
- [9] MARYAN AS, MONTAZER M, HARIFI T. Synthesis of nano silver on cellulosic denim fabric producing yellow colored garment with antibacterial properties[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 115: 568-574.
- [10] EISENBRAND G, HIPPE F, JAKOBS S, MUEHLBEYER S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytochemistry[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2004, 130(11): 627-635.
- [11] LIN YK, LEU YL, YANG SH, CHEN HW, WANG CT, PANG JH S. Anti-psoriatic effects of indigo

- naturalis on the proliferation and differentiation of keratinocytes with indirubin as the active component[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2009, 54(3): 168-174.
- [12] HOESSEL R, LECLERC S, ENDICOTT JA, NOBEL MEM, LAWRIE A, TUNNAH P, LEOST M, DAMIENS E, MARIE D, MARKO D, NIEDERBERGER E, TANG WC, EISENBRAND G, MEIJER L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases[J]. *Nature Cell Biology*, 1999, 1(1): 60-67.
- [13] KAMELAMELA N, ZALESNE M, MORIMOTO J, ROBBAT A, WOLFE BE. Indigo- and indirubin-producing strains of *Proteus* and *Psychrobacter* are associated with purple rind defect in a surface-ripened cheese[J]. *Food Microbiology*, 2018, 76: 543-552.
- [14] PINHEIRO D, PINEIRO M, PINA J, BRANDÃO P, GALVÃO AM, SEIXAS de MELO JS. Tryptanthrin from indigo: synthesis, excited state deactivation routes and efficient singlet oxygen sensitization[J]. *Dyes and Pigments*, 2020, 175: 108125.
- [15] KOLACZKOWSKI MA, LIU Y. Functional organic semiconductors based on bay-annulated indigo (BAI)[J]. *Chemical Record*, 2019, 19(6): 1062-1077.
- [16] KLIMOVICH IV, LESHANSKAYA LI, TROYANOV SI, ANOKHIN DV, NOVIKOV DV, PIRYAZEV AA, IVANOV DA, DREMOVA NN, TROSHIN PA. Design of indigo derivatives as environment-friendly organic semiconductors for sustainable organic electronics[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2014, 2(36): 7621-7631.
- [17] NGAI JHL, LEUNG LM, SO SK, LEE HKH. Organic soluble indigoids derived from 3-hydroxybenzaldehyde for N-type organic field-effect transistor (OFET) applications[J]. *Organic Electronics*, 2016, 32: 258-266.
- [18] LOPES HFS, TU ZH, SUMI H, YUMOTO I. Analysis of bacterial flora of indigo fermentation fluids utilizing composted indigo leaves (*sukumo*) and indigo extracted from plants (Ryukyu-ai and Indian indigo)[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 132(3): 279-286.
- [19] RAVELOMBOLA W, TROSTLE C, CASON J, ALE S, MANLEY A, PHAM H. Current status of the genetic and agronomic of industrial indigo *Indigofera* sp.[J]. *Euphytica*, 2023, 219(12): 128.
- [20] CHANDEL N, SINGH BB, DUREJA C, YANG YH, BHATIA SK. Indigo production goes green: a review on opportunities and challenges of fermentative production[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2024, 40(2): 62.
- [21] 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 RR, MA WH, XIAO Y. Research advances in enzymes involved in indigo biosynthesis[J]. *Biotic Resources*, 2023, 45(4): 328-340 (in Chinese).
- [22] FABARA AN, FRAAIJE MW. An overview of microbial indigo-forming enzymes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(3): 925-933.
- [23] ZHANG XW, QU YY, MA Q, ZHOU H, LI XL, KONG CL, ZHOU JT. Cloning and expression of naphthalene dioxygenase genes from *Comamonas* sp. MQ for indigoids production[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(4): 581-587.
- [24] LU Y, MEI LH. Co-expression of P450 BM3 and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34(3): 247-253.
- [25] CHEN L, XU JK, LI LZ, GAO SQ, WEN GB, LIN YW. Design and engineering of neuroglobin to catalyze the synthesis of indigo and derivatives for textile dyeing[J]. *Molecular Systems Design & Engineering*, 2022, 7(3): 239-247.
- [26] LONČAR N, van BEEK HL, FRAAIJE MW. Structure-based redesign of a self-sufficient flavin-containing monooxygenase towards indigo production[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(24): 6148.
- [27] MERCADAL JPR, ISAAC P, SIÑERIZ F, FERRERO MA. Indigo production by *Pseudomonas* sp. J26, a marine naphthalene-degrading strain[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2010, 50(3): 290-293.
- [28] LI YQ, LIN YW, WANG F, WANG JH, SHOJI O, XU JK. Construction of biocatalysts using the P450 scaffold for the synthesis of indigo from indole[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 2395.
- [29] KONG FH, CHEN J, QIN XQ, LIU CF, JIANG YP, MA L, XU HF, LI SY, CONG ZQ. Evolving a P450BM3 peroxxygenase for the production of indigoid dyes from indoles[J]. *ChemCatChem*, 2022, 14: e202201151.
- [30] 李妍清. 基于细胞色素 P450 构建吲哚合成靛蓝的生

- 物催化剂[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2023.
- LI YQ. Construction of biocatalysts using the P450 scaffold for the synthesis of indigo from indole[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [31] ULLRICH R, PORAJ-KOBIELSKA M, HEROLD-MAJUMDAR OM, VIND J, HOFRICHTER M. Synthesis of indigo-dyes from indole derivatives by unspecific peroxygenases and their application for *in-situ* dyeing[J]. *Catalysts*, 2021, 11: 1495.
- [32] FABARA AN, FRAAIJE MW. Production of indigo through the use of a dual-function substrate and a bifunctional fusion enzyme[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 142: 109692.
- [33] 丁爽, 陈修来, 高聪, 宋伟, 吴静, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 模块化工程改造大肠杆菌生产 L-色氨酸[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2359-2374.
- DING S, CHEN XL, GAO C, SONG W, WU J, WEI WQ, LIU J, LIU LM. Modular engineering of *Escherichia coli* for high-level production of L-tryptophan[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2359-2374 (in Chinese).
- [34] LEE J, KIM J, SONG JE, SONG WS, KIM EJ, KIM YG, JEONG HJ, KIM HR, CHOI KY, KIM BG. Production of Tyrian purple indigoid dye from tryptophan in *Escherichia coli*[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(1): 104-112.
- [35] ROTILIO L, SWOBODA A, EBNER K, RINNOFNER C, GLIEDER A, KROUTIL W, MATTEVI A. Structural and biochemical studies enlighten the unspecific peroxygenase from *Hypoxylon* sp. EC38 as an efficient oxidative biocatalyst[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(18): 11511-11525.
- [36] LIU C, XU JK, GAO SQ, HE B, WEI CW, WANG XJ, WANG ZH, LIN YW. Green and efficient biosynthesis of indigo from indole by engineered myoglobins[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(58): 33325-33330.
- [37] DAI CX, MA Q, LI Y, ZHOU DD, YANG BY, QU YY. Application of an efficient indole oxygenase system from *Cupriavidus* sp. SHE for indigo production[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(12): 1963-1971.
- [38] YANG ZY, WANG RS, CHENG BY, RUAN V, YANG PJ, LIANG CH, SHEN CR. Key residues identified by random mutagenesis enhanced indole hydroxylation efficiency of the flavin-containing monooxygenase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2023, 199: 109064.
- [39] YIN HF, CHEN HP, YAN M, LI ZK, YANG RD, LI YJ, WANG YF, GUAN JY, MAO HL, WANG Y, ZHANG YY. Efficient bioproduction of indigo and indirubin by optimizing a novel terpenoid cyclase Xial in *Escherichia coli*[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(31): 20569-20576.
- [40] MOURI T, KAMIYA N, GOTO M. New strategy to enhance catalytic performance of *Escherichia coli* whole cell biocatalysts harboring P450cam mutants[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 53(2): 229-233.
- [41] LI G, YOUNG KD. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 2): 402-410.

(本文责编 陈宏宇)