

## 生物育种与工艺优化

# 酶法转化 L-谷氨酸生产 $\alpha$ -酮戊二酸

牛盼清<sup>1,2,3</sup>, 张震宇<sup>2</sup>, 刘立明<sup>1,2,3</sup>

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 食品微生物制造工程实验室, 江苏 无锡 214122

牛盼清, 张震宇, 刘立明. 酶法转化 L-谷氨酸生产 $\alpha$ -酮戊二酸. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1318-1322.

Niu PQ, Zhang ZY, Liu LM. Enzymatic production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by L-glutamate oxidase from L-glutamic acid. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1318-1322.

**摘要:** 利用 L-谷氨酸氧化酶 (LGOX), 对酶法转化 L-谷氨酸生产 $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -KG) 的工艺条件进行了研究。首先对野生菌链霉菌 *Streptomyces* sp. FMME066 进行亚硝基胍诱变, 获得一株遗传性状稳定的突变株 *Streptomyces* sp. FMME067; 突变株在最优培养基 (g/L): 果糖 10, 蛋白胨 7.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{CaCl}_2$  0.05 条件下, LGOX 酶活为 0.14 U/mL。LGOX 的生化特征为最适 pH 8.5、温度 35 °C,  $\text{Mn}^{2+}$  是激活剂。对 LGOX 转化 L-谷氨酸生产 $\alpha$ -KG 的条件进行优化, 在最优条件下转化 24 h,  $\alpha$ -KG 产量为 38.1 g/L, 转化率为 81.4%。研究结果为开发 LGOX 酶法转化生产 $\alpha$ -KG 的工业化奠定了坚实的基础。

**关键词:** L-谷氨酸氧化酶, 生化特征, 发酵优化, 酶法转化

## Enzymatic production of $\alpha$ -ketoglutaric acid by L-glutamate oxidase from L-glutamic acid

Panqing Niu<sup>1,2,3</sup>, Zhenyu Zhang<sup>2</sup>, and Liming Liu<sup>1,2,3</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

3 Laboratory of Food Microbial-Manufacturing Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** We produced  $\alpha$ -ketoglutaric acid ( $\alpha$ -KG) from L-glutamic acid, using enzymatic transformation approach with L-glutamate oxidase (LGOX). First, wild strain *Streptomyces* sp. FMME066 was mutated with NTG, a genetically stable mutant *Streptomyces* sp. FMME067 was obtained. Under the optimal nutrition conditions with fructose 10 g/L, peptone 7.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L and  $\text{CaCl}_2$  0.05 g/L, the maximum LGOX activity reached 0.14 U/mL. The LGOX was stable to pH and temperature, and  $\text{Mn}^{2+}$  had a stimulating effect. Finally, after 24 h enzymatic conversion under the optimal conditions,

**Received:** October 8, 2013; **Accepted:** November 28, 2013

**Supported by:** The Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province (No. BE2013612), Program for Young Talents in China, the Provincial Outstanding Youth Foundation of Jiangsu Province (No. BK2012002).

**Corresponding author:** Zhenyu Zhang. Tel: +86-510-85327026; E-mail: zhangzy@jiangnan.edu.cn

Liming Liu. Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

江苏省科技支撑计划社会发展项目 (No. BE2013612), 中组部青年拔尖人才支持计划, 江苏省杰出青年基金 (No. BK2012002) 资助。

网络出版时间: 2014-02-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130511.html>

the maximum titer of  $\alpha$ -KG reached 38.1 g/L from 47 g/L L-glutamic acid. Enzymatic transformation by LGOX is a potential approach for  $\alpha$ -KG production.

**Keywords:** L-glutamate oxidase, biochemical properties, fermentation optimization, enzymatic transformation

作为三羧酸循环和氨基酸代谢中重要的二元酸,  $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -KG) 在氨基酸形成和氮转运中扮演着重要的角色,  $\alpha$ -KG 广泛应用于制药学、精细化工和动物饲料等工业领域<sup>[1]</sup>。通过菌株筛选、代谢调控、过程优化和代谢工程改造, 发酵法生产  $\alpha$ -KG 取得了很大进展, 光滑球拟酵母 *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019 以葡萄糖为碳源, 发酵 64 h 后  $\alpha$ -KG 浓度为 43.7 g/L<sup>[2]</sup>; 解脂耶氏酵母 *Y. lipolytica* WSH-Z06 以甘油为碳源发酵 168 h,  $\alpha$ -KG 浓度为 66.2 g/L<sup>[3]</sup>。但由于发酵过程中丙酮酸、富马酸、苹果酸等副产物过多, 发酵周期长等原因, 微生物发酵法还没有实现工业化生产。

根据 L-谷氨酸与  $\alpha$ -KG 结构特点, 寻找可将 L-谷氨酸中氨基转为酮基的重要酶制剂, 从而将 L-谷氨酸转化为  $\alpha$ -KG, 是实现 L-谷氨酸转化为高值比产品  $\alpha$ -KG 的潜在途径。L-氨基酸氧化酶<sup>[4-5]</sup> (LAAO)、L-谷氨酸脱氢酶<sup>[6]</sup> (GDH)、L-谷氨酸氧化酶<sup>[7-8]</sup> (LGOX) 可以将 L-谷氨酸中氨基氧化成酮基, 生成  $\alpha$ -KG。其中, LGOX 在将 L-谷氨酸转化生成  $\alpha$ -KG 的同时, 仅产生  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 这一反应过程不需要添加外源辅因子, 且对 L-谷氨酸有很强的底物专一性; 而 GDH 需要外源添加  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$ , 且 GDH 更利于将  $\alpha$ -KG 中的酮基还原成氨基生成 L-谷氨酸<sup>[9-10]</sup>; LAAO 底物专一性不强, 产物  $\alpha$ -KG 对 LAAO 有明显的抑制作用<sup>[11]</sup>。基于上述考虑, 本研究选择 LGOX 作为酶制剂用于转化 L-谷氨酸生产  $\alpha$ -KG 的研究。

本研究通过诱变获得一株高产 LGOX 突变株 *Streptomyces* sp. FMME067, 并对其发酵培养基进行优化, 在此基础上, 根据 LGOX 的生化特征, 对 LGOX 转化 L-谷氨酸生产  $\alpha$ -KG 的体系进行优

化, 为实现酶法转化 L-谷氨酸生产  $\alpha$ -KG 的工业化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

野生菌株 *Streptomyces* sp. FMME066 和突变株 *Streptomyces* sp. FMME067 由本实验室筛选并保藏。

#### 1.1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 4, 酵母提取物 4, 麦芽浸膏 10, pH 7.2, 115 °C 灭菌 20 min。发酵培养基 (g/L): 果糖 10, 蛋白胨 7.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{CaCl}_2$  0.05, pH 7.2, 115 °C 灭菌 20 min。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养方法

摇瓶培养方法: 参考文献[12], 250 mL 三角瓶中装液量 25 mL, 28 °C, 200 r/min 培养 36 h (种子培养基) 和 48 h (发酵培养基)。发酵罐发酵方法: 按 3% 接种量将培养 36 h 的种子培养基接种于 7 L 发酵罐中 (美国 NBS 公司, 装液量 3.5 L), 350 r/min, 通气量 3.5 L/min, 28 °C 培养 48 h。

#### 1.2.2 转化条件

磷酸缓 (pH 8.5) 冲液中添加一定浓度 L-谷氨酸钠、LGOX (粗酶液: 发酵上清液使用超滤膜浓缩 50 倍)、 $\text{H}_2\text{O}_2$  酶和  $\text{MnCl}_2$ , 于 500 mL 三角瓶中 (装液量 20 mL), 35 °C、200 r/min 转化 24 h。

#### 1.2.3 *Streptomyces* sp. FMME066 菌株诱变及筛选突变株

菌株诱变方法参考文献[13]进行, 根据 Trinder 反应 (反应液均匀喷洒至菌落表面, 周围形成紫色

变色圈), 将  $R$  值 (变色圈直径与菌落直径比值) 大的突变株进行发酵复筛和遗传稳定性实验。

### 1.2.4 LGOX 酶活测定

LGOX 酶活通过 Trinder 反应测定参考文献 [14], 1 U LGOX 定义为每分钟产生  $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  所需的酶量。

### 1.2.5 LGOX 蛋白纯化及生化特征的测定

蛋白纯化参考文献 [8] 进行, 纯化得到的 LGOX 参考文献 [15] 进行生化特征的测定。

### 1.2.6 $\alpha$ -KG 浓度测定方法

参考文献 [16] 利用高效液相色谱 (HPLC) 测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 平板显色反应筛选 LGOX 高产突变菌株

在野生菌株 *Streptomyces* sp. FMME066 (LGOX 生产能力  $0.002 \text{ U/mL}$ ) 的基础上, 为了进一步提高菌株发酵产酶能力, 对其孢子进行 NTG 诱变处理, 根据 Trinder 反应, 测定菌落  $R$  值。22 株菌产酶能力 ( $R$  值) 比野生菌株 ( $R$  值 1.57) 高; 进一步发酵验证, 有 5 株产酶能力超过  $0.01 \text{ U/mL}$ 。遗传稳定性实验发现突变株 FMME067 表现出较强的 LGOX 生产能力和良好的遗传稳定性, 故选取 FMME067 作为后续研究菌株。

### 2.2 突变株 FMME067 发酵培养基优化

为进一步提高突变株 FMME067 生产 LGOX 能力, 采用单因素和正交实验对发酵培养基组成进行优化。在最优培养基: 果糖  $10 \text{ g/L}$ , 蛋白胨  $7.5 \text{ g/L}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1 \text{ g/L}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0.05 \text{ g/L}$  条件下培养 48 h, LGOX 酶活为  $0.144 \text{ U/mL}$ , 比优化前提高了 10 倍, 并于 7 L 发酵罐中进行了验证 (图 1)。

### 2.3 LGOX 蛋白纯化及生化特征分析

收集发酵上清液进行蛋白纯化 (表 1), 蛋白电泳发现 LGOX 为  $72 \text{ kDa}$  (图 2)。对纯化得到的 LGOX 进行生化特征研究, 发现 LGOX 最适 pH 为 8.5, 在 pH 7.5–9.5 范围内  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  存放 12 h, LGOX

相对酶活力保持 80% 以上。LGOX 最适温度为  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。同时发现  $\text{Mn}^{2+}$  对 LGOX 有明显的激活作用;  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  和  $\text{Ag}^+$  则对 LGOX 有不同程度的抑制作用, 其中  $\text{Ag}^+$  抑制作用最为明显。外源添加 FAD 对 LGOX 酶活性没有影响, 说明 LGOX 不需要外源添加 FAD, 对工业化应用具有重要意义。

### 2.4 L-谷氨酸氧化酶转化 L-谷氨酸生产 $\alpha$ -KG

根据 LGOX 的生化特性, 对 LGOX 粗酶液转化 L-谷氨酸生产  $\alpha$ -KG 条件进行优化。在 pH 8.5、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$  转化条件下, 随着 L-谷氨酸浓度的增加,  $\alpha$ -KG 产量不断增加。当 L-谷氨酸浓度大于  $23.4 \text{ g/L}$  后,  $\alpha$ -KG 产量不再增加。可能是转化过程中产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 LGOX 的抑制作用, 通过添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  酶去除  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 如图 3 所示, 随着 L-谷氨酸浓度的增加,  $\alpha$ -KG 产量不断增加。对  $\text{H}_2\text{O}_2$  酶添加量和底物浓度之间的关系进行优化, 发现底物 L-谷氨酸浓度与添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  酶最适比例为  $12 : 5 \text{ (g: kV)}$ , 在  $47 \text{ g/L}$  的底物 L-谷氨酸条件下, 通过添加  $20 \text{ U/mL}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  酶去除  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\alpha$ -KG 产量为  $32.9 \text{ g/L}$ , 比未添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  酶提高了 126.9%, 证明了  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 LGOX 的抑制作用。

由于  $\text{Mn}^{2+}$  对 LGOX 有激活作用, 在 LGOX 粗酶液转化过程中研究不同浓度  $\text{Mn}^{2+}$  对  $\alpha$ -KG 产量的影响, 发现当添加  $5 \text{ mmol/L}$  的  $\text{MnCl}_2$  时, 转化 24 h 后,  $\alpha$ -KG 产量最高, 为  $38.1 \text{ g/L}$ , 比对照 (未

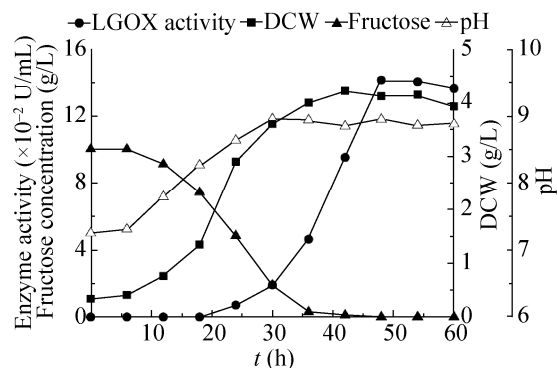


图 1 突变株 FMME067 发酵生产 LGOX 过程参数变化曲线

Fig. 1 Time courses of FMME067 fermentation.

表 1 LGOX 纯化过程

Table 1 Purification of L-glutamate oxidase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification
1. Culture filtrate (1 L)	1 409	144.3	0.10	100.0	0.0
2. Amicon Ultra-15 10K	546	142.7	0.26	98.9	2.6
3. Ammonium sulfate	47.6	137.1	2.88	95.0	28.8
4. CM-Sephadex C-50	15.6	113.7	7.29	78.8	72.9

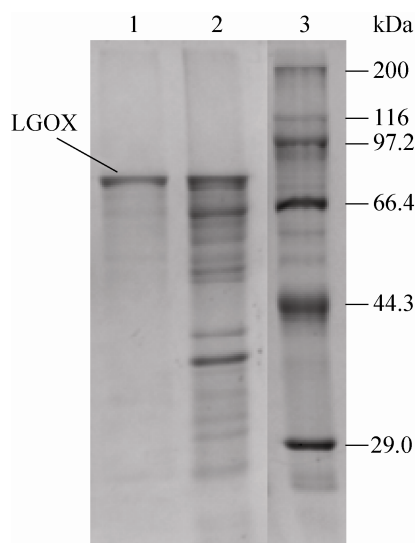


图 2 LGOX 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of LGOX from FMME067. 1: purified LGOX; 2: culture supernatant; 3: protein marker.

添加  $Mn^{2+}$ ) 提高了 15.8% (图 4A)。从转化过程曲线分析可知 (图 4B),  $\alpha$ -KG 产量在 24 h 达到最大值, 在添加 5 mmol/L 的  $MnCl_2$  条件下,  $\alpha$ -KG 初始生成速率为 3.53 g/(L·h), 平均生成速率为 1.58 g/(L·h)。

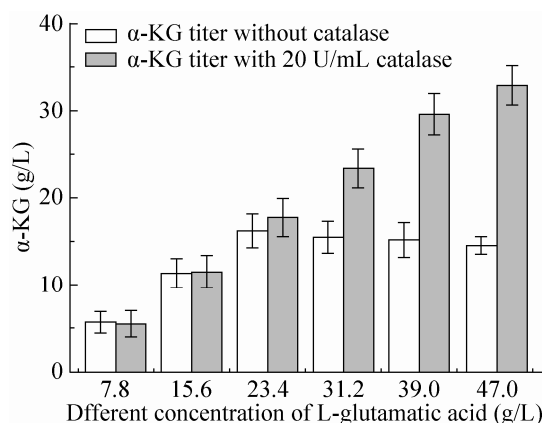
图 3 不同浓度 L-谷氨酸和添加  $H_2O_2$  酶对转化的影响

Fig. 3 Different L-glutamic acid concentration and catalase on  $\alpha$ -KG titer.

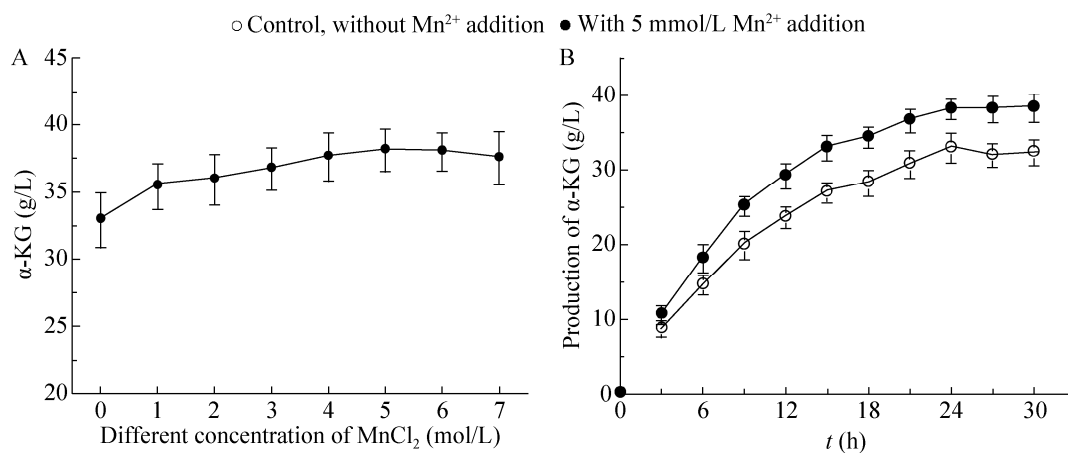
图 4 不同浓度  $Mn^{2+}$  转化实验和  $\alpha$ -KG 转化过程曲线

Fig. 4 Effect of different concentration  $Mn^{2+}$  on  $\alpha$ -KG titer and time course on  $\alpha$ -KG titer. (A) Effect of different concentration  $Mn^{2+}$  on  $\alpha$ -KG titer. (B) Time course on  $\alpha$ -KG titer.

### 3 结论

由于化学合成法生产 $\alpha$ -KG 污染较大, 发酵法周期长、副产物多等原因, 本研究以 L-谷氨酸和 $\alpha$ -KG 的结构特征为出发点, 选取可以将氨基氧化成酮基的 LGOX, 以 L-谷氨酸为底物, 来开发酶法转化生产 $\alpha$ -KG 新工艺, 以进一步提高生产 $\alpha$ -KG 效率, 降低生产成本。通过发酵培养基优化, 突变株 FMME067 生产 LGOX 最大酶活为 0.14 U/mL, 比野生菌株提高了 70 倍; 在最优转化条件下, 24 h 内 LGOX 粗酶液转化 L-谷氨酸生产 $\alpha$ -KG 产量为 38.1 g/L, 转化率为 81.4%。

### REFERENCES

- [1] Chernyavskaya OG, Shishkanova NV, Il'chenko AP, et al. Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(2): 152-158.
- [2] Liu LM, Li Y, Zhu Y, et al. Redistribution of carbon flux in *Torulopsis glabrata* by altering vitamin and calcium level. *Metab Eng*, 2007, 9(1): 21-29.
- [3] Yu ZZ, Du GG, Zhou JW, et al. Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. *Bioresour Technol*, 2012, 114: 597-602.
- [4] Geueke B, Hummel W. A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31(1/2): 77-87.
- [5] Yu ZL, Qiao H. Advances in non-snake venom L-amino acid oxidase. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 167(1): 1-13.
- [6] Odman P, Wellborn WB, Bommarius AS. An enzymatic process to alpha-ketoglutarate from L-glutamate: the coupled system L-glutamate dehydrogenase/NADH oxidase. *Tetrahedron-Asymmetr*, 2004, 15(18): 2933-2937.
- [7] Arima J, Sasaki C, Sakaguchi C, et al. Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *Febs J*, 2009, 276(14): 4318-4327.
- [8] Bohmer A, Muller A, Passarge M, et al. A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus* purification and properties. *Eur J Biochem*, 1989, 182(2): 327-332.
- [9] Consalvi V, Chiaraluce R, Politi L, et al. Glutamate-dehydrogenase from the thermoacidophilic Archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Eur J Biochem*, 1991, 196(2): 459-467.
- [10] Huang BQ, Qin PY, Xu ZW, et al. Effects of CaCl<sub>2</sub> on viscosity of culture broth, and on activities of enzymes around the 2-oxoglutarate branch, in *Bacillus subtilis* CGMCC 2108 producing poly-(gamma-glutamic acid). *Bioresour Technol*, 2011, 102(3): 3595-3598.
- [11] Liu L, Hossain GS, Shin HD, et al. One-step production of alpha-ketoglutaric acid from glutamic acid with an engineered L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. *J Biotechnol*, 2013, 164(1): 97-104.
- [12] Fu ML. Research on bioproduction of 8-prenylnaringenin from isoxanthohumol [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012 (in Chinese). 傅明亮. 生物催化异黄酮合成 8-异戊烯基柚皮素研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [13] Toshio K, Kazuko A, Hajime S, et al. L-glutamate oxidase from *Streptomyces violascens*. I. production, isolation and some properties. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(4): 1307-1314.
- [14] Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, 1974, 20(4): 470-475.
- [15] Arima J, Tamura T, Kusakabe H, et al. Recombinant expression, biochemical characterization and stabilization through proteolysis of an L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *J Biochem*, 2003, 134(6): 805-812.
- [16] Zhang DD, Liang N, Liu LM, et al. Enhancement of  $\alpha$ -ketoglutarate production in *Torulopsis glabrata*: redistribution of carbon flux from pyruvate to  $\alpha$ -ketoglutarate. *Biotechnol Bioproc E*, 2009, 14: 134-139.

(本文责编 陈宏宇)