·生物育种与工艺优化·

亮氨酸脱氢酶偶联NADH再生体系合成L-2-氨基丁酸

张利坤[1]，肖延铭[1]，杨卫华[1]，华超[1]，王云[1]，李敬亚[1]，杨套伟[2]

1 长兴制药股份有限公司 工业生物催化与转化浙江省工程研究中心，浙江 长兴 313100
2 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122

张利坤, 肖延铭, 杨卫华, 等. 亮氨酸脱氢酶偶联 NADH 再生体系合成 L-2-氨基丁酸. 生物工程学报, 2020, 36(5): 992–1001.
Zhang LK, Xiao YM, Yang WH, et al. Synthesis of L-2-aminobutyric acid by leucine dehydrogenase coupling with an NADH regeneration system. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 992–1001.

摘 要: 文中以大肠杆菌 BL21(DE3) 为宿主，构建两株分别共表达亮氨酸脱氢酶 (LDH，来源蜡样芽孢杆菌)/甲酸脱氢酶 (FDH，来源水生弯杆菌) 和亮氨酸脱氢酶 (LDH，来源蜡样芽孢杆菌)/醇脱氢酶 (ADH，来源红球菌)的重组大肠杆菌。通过偶联两种不同 NADH 再生体系，以 L-苏氨酸为起始原料，利用苏氨酸脱氨酶 (L-TD) 与 LDH-FDH 或 LDH-ADH 一锅法合成 L-2-氨基丁酸，并对 LDH-FDH 工艺和 LDH-ADH 工艺进行对比优化。LDH-FDH 工艺的最适反应 pH 为 7.5，最适反应温度为 35 ℃，通过加入 50 g/L 甲酸铵、0.3 g/L NAD^+、10% LDH-FDH 粗酶液 (*V/V*) 和 7 500 U/L 的 L-TD 酶液，对 L-苏氨酸进行分批补加，以便控制 2-丁酮酸浓度小于 15 g/L，反应 28 h，实现了 L-2-氨基丁酸的产量为 161.8 g/L，产率 97%。LDH-ADH 工艺的最适 pH 为 8.0，最适反应温度为 35 ℃，通过加入 0.3 g/L NAD^+、10% LDH-ADH 粗酶液 (*V/V*) 及 7 500 U/L 的 L-TD 酶液，分批补加 L-苏氨酸及 1.2 倍摩尔量异丙醇，以便控制 2-丁酮酸浓度小于 15 g/L，且每生成约 40 g/L 的 L-2-氨基丁酸，抽真空去除丙酮，反应 24 h，实现了 L-2-氨基丁酸的产量为 119.6 g/L，产率 98%。文中所采用的工艺及结果可为 L-2-氨基丁酸的工业化提供一定的参考依据。

关键词: 共表达，L-2-氨基丁酸，生物催化，NADH 再生

Synthesis of L-2-aminobutyric acid by leucine dehydrogenase coupling with an NADH regeneration system

Likun Zhang[1], Yanming Xiao[1], Weihua Yang[1], Chao Hua[1], Yun Wang[1], Jingya Li[1], and Taowei Yang[2]

1 *Zhejiang Engineering Research Center of Industrial Biocatalysis and Transformation, Changxing Pharmaceutical Co. Ltd., Changxing* 313100, *Zhejiang, China*
2 *School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi* 214122, *Jiangsu, China*

Abstract: In this study, *Escherichia coli* BL21 (DE3) was used as the host to construct 2 recombinant *E. coli* strains that

Received: June 20, 2019; **Accepted:** September 29, 2019
Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2015AA021004).
Corresponding author: Yanming Xiao. Tel: +86-572-6210258; E-mail: hrbxym1286@yeah.net
国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2015AA021004) 资助。
网络出版时间：2019-10-24 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20191024.1153.001.html

co-expressed leucine dehydrogenase (LDH, *Bacillus cereus*)/formate dehydrogenase (FDH, *Ancylobacter aquaticus*), or leucine dehydrogenase (LDH, *Bacillus cereus*)/alcohol dehydrogenase (ADH, *Rhodococcus*), respectively. L-2-aminobutyric acid was then synthesized by L-threonine deaminase (L-TD) with LDH-FDH or LDH-ADH by coupling with two different NADH regeneration systems. LDH-FDH process and LDH-ADH process were optimized and compared with each other. The optimum reaction pH of LDH-FDH process was 7.5, and the optimum reaction temperature was 35 °C. After 28 h, the concentration of L-2-aminobutyric acid was 161.8 g/L with a yield of 97%, when adding L-threonine in batches for controlling 2-ketobutyric acid concentration less than 15 g/L and using 50 g/L ammonium formate, 0.3 g/L NAD^+, 10% LDH-FDH crude enzyme solution (*V/V*) and 7 500 U/L L-TD. The optimum reaction pH of LDH-ADH process was 8.0, and the optimum reaction temperature was 35 °C. After 24 h, the concentration of L-2-aminobutyric acid was 119.6 g/L with a yield of 98%, when adding L-threonine and isopropanol (1.2 times of L-threonine) in batches for controlling 2-ketobutyric acid concentration less than 15 g/L, removing acetone in time and using 0.3 g/L NAD^+, 10% LDH-ADH crude enzyme solution (*V/V*) and 7 500 U/L L-TD. The process and results used in this paper provide a reference for the industrialization of L-2-aminobutyric acid.

Keywords: co-expression, L-2-aminobutyric acid, biocatalysis, NADH regeneration

L-2-氨基丁酸 (L-2-aminobutyric acid，L-ABA) 是抑制人体神经信息传递、促进脑细胞代谢的一种非天然手性氨基酸，也是一种重要的手性医药中间体，通过对其末端羧基还原可用于制备抗结核药物盐酸乙胺丁醇[1]，也可通过酰胺化制备抗癫痫药物左乙拉西坦及布瓦西坦[2-3]。目前，L-2-氨基丁酸的合成方法包括化学法和生物法。化学法包括以氨化水解法、丁酮酸还原法、脱硫法等[4]，但化学合成反应条件苛刻、易生成副产物和消旋产物、产物分离困难、立体选择性差、工业生产成本高、对环境污染大。生物法包括微生物发酵法和酶催化法，发酵法易伴随副产物生成，产物分离提取较困难。酶催化法具有反应条件温和、立体选择性高、环境污染少等优点。目前酶催化法制备 L-2-氨基丁酸主要有两种：一是对消旋 DL-氨基丁酸进行拆分[5-7]，理论转化为 50%；二是通过转氨酶[8-10]或脱氢酶[11-14]以 2-丁酮酸 (2-ketobutyric acid，2-KBA) 为底物进行不对称合成，该方法常偶联苏氨酸脱氨酶 (Threonine deaminase，L-TD) 将廉价 L-苏氨酸 (L-Threonine，L-Thr) 转化为 2-丁酮酸，理论转化可达 100%。由于利用转氨酶合成需要引入新氨基酸为氨基供体，反应过程较为复杂，且易伴随副产物生成，产率不理想，工业化较难。目前，比较常用的是用亮氨酸脱氢酶 (Leucine dehydrogenase，LDH)[15] 以还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (还原型辅酶Ⅰ，NADH) 作为辅酶，耦合辅酶再生体系用于 L-2-氨基丁酸制备。

辅酶再生体系可选用以葡萄糖脱氢酶 (Glucose dehydrogenase，GDH) 催化葡萄糖、甲酸脱氢酶 (Formate dehydrogenase，FDH) 催化甲酸铵[16]、醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase，ADH) 催化异丙醇用于 NADH 的循环再生[17]。葡萄糖脱氢酶的 NADH 再生系统由于伴有大量葡萄糖酸盐副产物的生成，产物分离纯化较难，工业化难度大；基于甲酸脱氢酶的 NADH 再生系统所产生的副产物为 CO_2，对产物后分离无影响，尽管反应结束后残留部分甲酸盐，但较前者而言产物分离较易；基于醇脱氢酶 NADH 再生系统的副产物为丙酮，较前两者更易分离除去。本文将 LDH 基因分别与 FDH 基因和 ADH 基因通过质粒 pRSFDuet-1 构建 pRSFDuet-*ldh*-*fdh* 及 pRSFDuet-*ldh*-*adh*，进而利用重组菌串联表达 LDH-FDH 及 LDH-ADH，分别偶联 L-TD 制备 L-2 氨基丁酸，并对上述两种工艺进行探究 (图 1)[11,17]，提供一条底物转化率高、生产成本低且易于工业化的 L-2-氨基丁酸生产工艺。

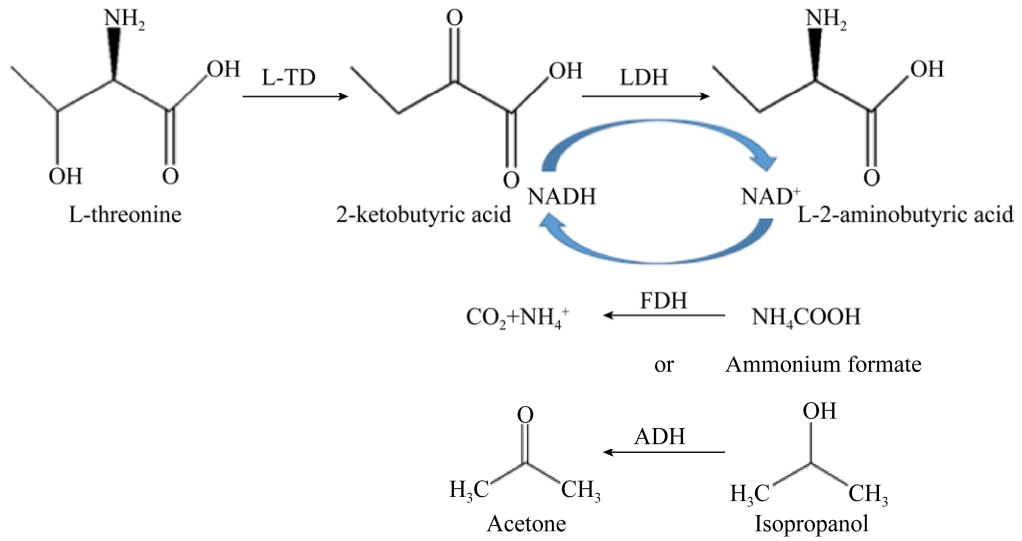

图 1　生物催化合成 L-2-氨基丁酸[11,17]

Fig. 1　Enzyme catalysis L-2-aminobutyric acid[11,17].

1　材料与方法

1.1　质粒与菌株

大肠杆菌 *E. coli* DH5α、*E. coli* BL21(DE3)、质粒 pET28a(+)-*ldh*、pET28a(+)-*adh*、pET28a(+)-*fdh*、pRSFDuet-1 与 L-TD (GenBank 登录号 APK04219.1) 粗酶液 (酶活力 2 000 U/mL) 均由长兴制药研发中心分子实验平台构建保存。

1.2　培养基

发酵培养基：蛋白胨 10 g/L，酵母膏 5 g/L，NaCl 5 g/L。调节 pH 至 7.2，121 ℃灭菌 20 min。向灭菌后的培养基中添加事先配制成一定浓度过滤除菌的卡那霉素,使其终质量浓度为 50 μg/mL。

固体培养基：蛋白胨 10 g/L，酵母膏 5 g/L，NaCl 5 g/L，琼脂 20 g/L，调节 pH 至 7.2，121 ℃灭菌 20 min。向灭菌后的培养基中添加事先配制成一定浓度过滤除菌的卡那霉素，使其终质量浓度为 50 μg/mL。

1.3　主要试剂

限制性内切核酸酶、*Taq* DNA 聚合酶、PrimeSTAR DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购于 TaKaRa；基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 清洁试剂盒购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司；L-苏氨酸、2-丁酮酸、甲酸铵、L-2-氨基丁酸购于阿拉丁；烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (辅酶Ⅰ，NAD^+) 购于国药集团化学试剂有限公司；其他常规试剂均为市售分析纯。

1.4　重组载体诱导表达

1.4.1　重组载体串联构建

根据 NCBI 数据库中亮氨酸脱氢酶基因 *ldh* 序列 (GenBank 登录号 CP034551.1)、醇脱氢酶 ADH 序列 (GenBank 登录号 KDE12735.1) 以及甲酸脱氢酶基因 *fdh* 序列 (GenBank 登录号 AB091484.1) 设计引物，如表 1 所示。分别以质粒 pET28a(+)-*ldh*、pET28a(+)-*adh*、pET28a(+)-*fdh* 为模板，使用表 1 中对应的引物进行 PCR，分别扩增得到 *ldh*、*adh*、*fdh* 基因片段，将上述三者 DNA 片段经琼脂糖凝胶回收后，用对应的限制性内切酶进行双酶切，随后使用 DNA 清洁试剂盒进行 DNA 纯化获得酶切产物。*fdh* 或 *adh* 基因片段与经同样双酶切处理的线性质粒 pRSFDuet-1 混匀，用 T4 DNA 连接酶 16 ℃过夜连接，将重组质粒转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞，涂布到

表 1　本实验用到的引物

Table 1　Primers used in this experiment

Primer name	Primer sequences (5′–3′)	Size (bp)
LDH-P1	CATGCCATGGCAGGAACATTAGAAATCTTCGAATA (*Nco* Ⅰ)	35
LDH-R1	TTGCGGCCGCTTAGCGACGGCTAATAATATCGTG (*Not* Ⅰ)	34
FDH-P2	GGAATTCCATATGGCGAAAGTACTCTGCGTTCTCTACG (*Nde* Ⅰ)	38
FDH-R2	GATCTCGAGTCAGCCGGCTTTTTTGAATTTACCCGCC (*Xho* Ⅰ)	37
ADH-P2	CGCCATATGAAAGCAGTCCAGTACACCGA (*Nde* Ⅰ)	29
ADH-R2	CCGCTCGAGTCACGGAACCACGACACCACG (*Xho* Ⅰ)	30

The underlined sequences are restriction enzyme sites.

固体培养基，37 ℃培养 18 h，通过菌落 PCR 将筛选阳性克隆子接入发酵培养基中，37 ℃、150 r/min 培养 8 h，使用质粒提取试剂盒提取质粒，对重组质粒用 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切验证。获得的重组质粒 pRSFDuet-*fdh* 或 pRSFDuet-*adh* 用 *Nco* Ⅰ和 *Not* Ⅰ进行双酶切，经纯化后与经同样双酶切处理的 *ldh* 基因片段混匀，重复上述操作分别获得重组质粒 pRSFDuet-*ldh-fdh* 和 pRSFDuet-*ldh-adh*，并进行测序验证。

1.4.2　重组载体串联表达及粗酶液制备

将上述重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中，分别获得 *E. coli* BL21(DE3)/pRSFDuet-*ldh-fdh* 和 *E. coli* BL21(DE3)/pRSFDuet-*ldh-adh*。将上述两种重组菌接种至固体培养基斜面，37 ℃培养 12 h，获得斜面菌体；用无菌水洗下培养好的斜面菌体接入装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中，37 ℃、150 r/min 培养 6–8 h 后，IPTG 诱导量 0.3 mmol/L，25 ℃、150 r/min 诱导培养 10–12 h。将发酵液离心 (8 000 r/min，10 min) 收集沉淀菌体。用 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 悬浮菌体，使菌体终质量浓度为 200 g/L，超声破碎 (冰浴，功率 400 W，工作 5 s，间隔 5 s) 20 min，4 ℃、6 000 r/min 离心 25 min，保留上清分别得到 LDH-FDH 和 LDH-ADH 粗酶液。

1.5　酶活测定

本文通过串联表达获得 LDH-FDH 或 LDH-ADH，若单独测 LDH、FDH、ADH 酶活不具代表性，将串联表达酶当作整体，以 L-2-氨基丁酸生成量为衡量标准更加直观。

LDH-FDH 酶活测定：反应体系包括：100 mmol/L 2-丁酮酸，0.2 mmol/L NAD^+，120 mmol/L 甲酸铵，100 mmol/L NH_3/NH_4Cl 缓冲液 (pH 7.5)，1 mL LDH-FDH 粗酶液，总体积为 10 mL。35 ℃反应 10 min，强酸终止反应，液相检测 L-2-氨基丁酸生成量。酶活定义：上述反应条件下，1 min 产生 1 μmol L-2-氨基丁酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位，即 1 U。

LDH-ADH 酶活测定：反应体系包括：100 mmol/L 2-丁酮酸，0.2 mmol/L NAD^+，120 mmol/L 异丙醇，100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 8.0)，1 mL LDH-ADH 粗酶液，总体积为 10 mL。35 ℃反应 10 min，强酸终止反应，液相检测 L-2-氨基丁酸生成量。酶活定义：上述反应条件下，1 min 产生 1 μmol L-2-氨基丁酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位，即 1 U。

1.6　催化反应条件优化

为了探索催化反应的最佳反应条件，提高 L-2-氨基丁酸产量，分别对甲酸铵工艺 (LDH-FDH 工艺) 和醇脱氢酶工艺 (LDH-ADH 工艺) 条件进行优化。

1.6.1　L-苏氨酸一次性投加催化体系

LDH-FDH 500 mL 催化体系为：40 g/L L-苏氨酸，15 g/L 甲酸铵，0.3 g/L NAD^+，用氨水调节反应 pH 至 7.5，加入 10% LDH-FDH 粗酶液 (*V*/*V*) 和 7 500 U/L 的 L-TD 酶液，机械搅拌。反应条件：35 ℃、150 r/min，反应过程中用 40%甲酸维持 pH

7.5 左右，液相监测反应过程。

LDH-ADH 500 mL 催化体系为：40 g/L L-苏氨酸，4%异丙醇 (*V*/*V*)，0.3 g/L NAD^+，磷酸钾缓冲液 (100 mmol/L，pH 8.0)。用氨水调节反应 pH 至 8.0，加入 10% LDH-ADH 粗酶液 (*V*/*V*) 及 7 500 U/L 的 L-TD 酶液，机械搅拌。反应条件：35 ℃、150 r/min，液相监测反应过程。

1.6.2 L-苏氨酸分批投加催化体系

LDH-FDH 500 mL 催化体系为：10 g/L L-苏氨酸，50 g/L 甲酸铵，0.3 g/L NAD^+，用氨水调节反应 pH 至 7.5，加入 10% LDH-FDH 粗酶液 (*V*/*V*) 和 7 500 U/L 的 L-TD 酶液，机械搅拌，后续每隔 20–40 min 补加 10 g/L L-苏氨酸，根据体系中 2-丁酮酸残留量调整 L-苏氨酸补加时间间隔，使体系 2-丁酮酸浓度小于 15 g/L。反应条件：35 ℃、150 r/min，反应过程中用 40%甲酸维持 pH 7.5 左右，液相监测反应过程。

LDH-ADH 500 mL 催化体系为：10 g/L L-苏氨酸，0.8%异丙醇 (*V*/*V*)，0.3 g/L NAD^+，用氨水调节反应 pH 至 8.0，加入 10% LDH-ADH 粗酶液 (*V*/*V*) 及 7 500 U/L 的 L-TD 酶液，机械搅拌，后续每隔 20–40 min 补加 10 g/L L-苏氨酸及 1.2 倍摩尔量异丙醇，根据体系中 2-丁酮酸残留量调整 L-苏氨酸补加时间间隔，使体系 2-丁酮酸浓度小于 15 g/L。反应条件：35 ℃、150 r/min，用氨水维持 pH 8.0 左右，液相监测反应过程。

1.7 分析方法

L-苏氨酸、2-丁酮酸和 L-2-氨基丁酸的含量均由 HPLC 测定，L-苏氨酸、L-2-氨基丁酸分析条件：流动相为 0.05 mmol/L 醋酸钠溶液∶甲醇=7∶3，流速为 1.0 mL/min，检测紫外波长为 334 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL，色谱柱为 Agilent XDB-C8 (150 mm×4.6 mm)。

进样前样品需衍生，衍生剂配制：称取 0.343 g 邻苯二甲醛和 0.147 g N-乙酰半胱氨酸，置于 50 mL 容量瓶中，加 5 mL 无水乙醇，用 0.1 mmol/L 硼酸缓冲液 (pH 9.5) 定容。2-丁酮酸分析条件：流动相为 6 mmol/L 硫酸溶液，流速为 0.55 mL/min，检测紫外波长为 202 nm，柱温为 35 ℃，进样量为 10 μL，色谱柱为 Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm)。

2 结果与分析

2.1 重组酶的表达及酶活检测

重组质粒 pRSFDuet-*ldh*-*fdh* 和 pRSFDuet-*ldh*-*adh* 经测序验证无突变，分别转入 *E. coli* BL21(DE3) 中按照 1.4.2 方法制备 LDH-FDH 和 LDH-ADH 粗酶液均在 *E. coli* 中实现可溶性表达，结果如图 2 所示。SDS-PAGE 图中 LDH、FDH 和 ADH 的理论分子量分别为 39.4、43.9 和 35.2 kDa，与氨基酸序列计算的值一致，表明重组菌能正常串联表达 LDH-FDH 和 LDH-ADH。按 1.5 方法测定酶活，LDH-FDH 粗酶液酶活为 72.8 U/mL，LDH-ADH 粗酶液酶活为 65.1 U/mL。

2.2 pH 对催化反应影响

甲酸脱氢酶和醇脱氢酶工艺均同时涉及 3 种酶，因此有必要对催化反应的最适 pH 进行探索。

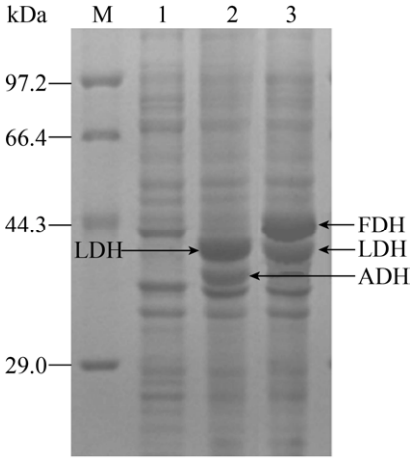

图 2 重组酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant enzymes. 1: control of *E. coli* BL21(DE3)/pRSFDuet-*ldh*-*fdh* or *E. coli* BL21(DE3)/pRSFDuet-*ldh*-*adh* which is not induced; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pRSFDuet-*ldh*-*adh* after induction; 3: *E. coli* BL21(DE3)/pRSFDuet-*ldh*-*fdh* after induction; M: protein marker.

但由于 L-TD 作为本企业已商品化的酶，在 pH 7.0–8.5 均表现为较高酶活，且该酶用量较少，工业化生产成本所占比重较低，因此本文主要考察 pH 对 LDH-FDH 和 LDH-ADH 酶活影响。不同 pH 下，分别测定 LDH-FDH 和 LDH-ADH 的酶活，以最高酶活为 100%，结果如图 3 所示。LDH-FDH 最适 pH 为 7.5，且在 pH 7.0–8.0 范围内相对酶活均大于 90%；LDH-ADH 最适 pH 为 8.5，且在 pH 7.5–8.5 范围内相对酶活均大于 90%。

2.3 温度对催化反应的影响

L-TD 在 30–40 ℃均表现出较高酶活，因此本文主要考察温度对 LDH-FDH 和 LDH-ADH 酶活影响。由于 2-丁酮酸对温度较敏感、不稳定，因此为了确定反应最佳温度，同时检测酶活测量体系中 2-丁酮酸的浓度。不同温度下，分别测定 LDH-FDH 的酶活及体系中 L-氨基丁酸与 2-丁酮酸含量，结果如图 4A、B 所示。LDH-FDH 最适温度为 35 ℃，此时反应液中 L-2-氨基丁酸浓度为 72.8 mmol/L，2-丁酮酸浓度为 25.1 mmol/L，物料基本守恒，40–45 ℃时，2-丁酮酸剩余量小于理论剩余量，物料表现不平衡，因此选用 35 ℃作为 LDH-FDH 最适催化温度。不同温度下 LDH-ADH 的酶活及体系中 L-2-氨基丁酸与 2-丁酮酸含量，结果如图 4C、D 所示。LDH-ADH 最适温度为 40 ℃，

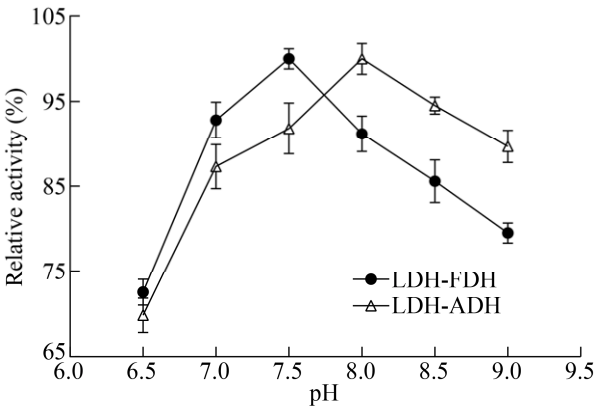

图 3 pH 对催化反应影响

Fig. 3 Effect of pH on the reaction.

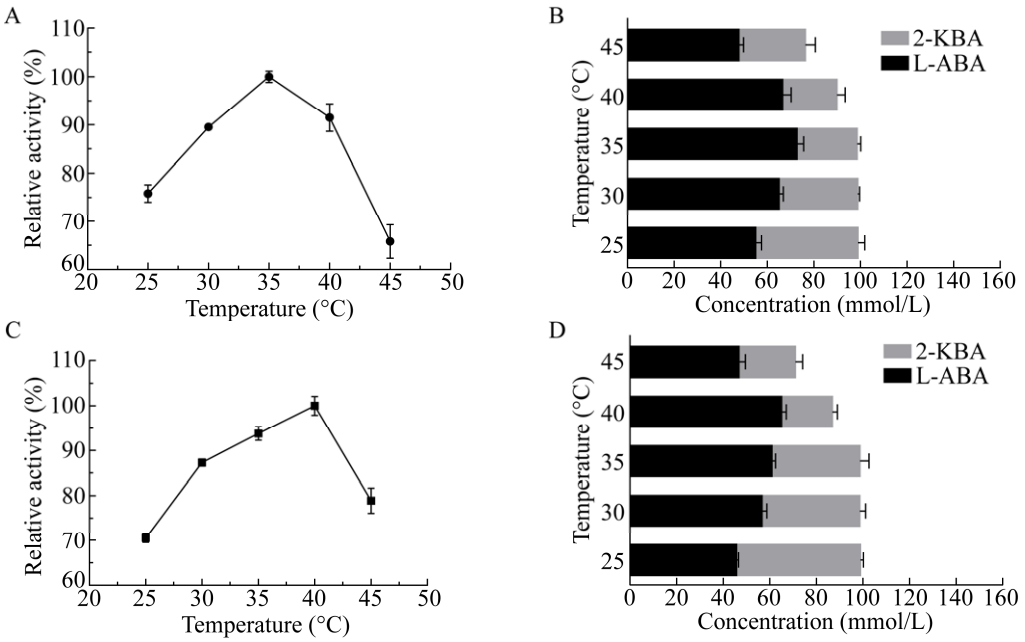

图 4 温度对催化反应的影响

Fig. 4 Effect of pH on the reaction. (A) Effect of temperature on LDH-FDH activity. (B) L-ABA and 2-KBA concentration in different temperature reaction systems of LDH-FDH. (C) Effect of temperature on LDH-ADH activity. (D) L-ABA and 2-KBA concentration in different temperature reaction systems of LDH-ADH.

此时反应液中 L-2-氨基丁酸浓度为 65.1 mmol/L，2-丁酮酸浓度为 21.9 mmol/L，尽管该温度下 L-2-氨基丁酸浓度达最高，但 2-丁酮酸浓度为 21.9 mmol/L，约为 2-丁酮酸理论剩余量的 60%，表明该温度会导致 2-丁酮酸变质或形成其他副产物，因此选用 35 ℃作为 LDH-ADH 最适催化温度。

2.4 L-苏氨酸浓度对催化反应影响

按照 1.6.1 方法，保持其他条件不变，添加不同浓度 L-苏氨酸，反应 24 h 检测 L-2-氨基丁酸生成量及 2-丁酮酸残留量，考察 L-苏氨酸浓度对催化反应影响。LDH-FDH 催化体系结果如图 5A、B 所示，随着 L-苏氨酸浓度增加，L-2-氨基丁酸产率逐渐下降，2-丁酮酸残留量逐步上升。当 L-苏氨酸浓度在 40–60 g/L 范围时，2-丁酮酸残留量较少，随着底物浓度增加，L-2-氨基丁酸生成量呈线性增长，产率均大于 95%。当 L-苏氨酸浓度增加至 80–120 g/L，2-丁酮酸积累严重，而 L-2-氨基丁酸生成量却未有明显增长，表明体系中积累 2-丁酮酸会抑制 LDH-FDH 的活性。LDH-ADH 催化体系结果如图 5C、D 所示，与 LDH-FDH 结果相似。以上两种工艺制备 L-2-氨基丁酸最高浓度均小于 60 g/L，且 NAD^+利用率较低。

2.5 2-丁酮酸浓度对催化反应影响

按照 1.6.1 方法，维持其他条件不变，将底物 L-苏氨酸更换为 2-丁酮酸，反应 1 h，考察不同浓度 2-丁酮酸对 LDH-FDH 及 LDH-ADH 催化反应影响，结果如图 6 所示。当 2-丁酮酸浓度在 5–15 g/L 范围时，LDH-FDH 及 LDH-ADH 转化体系中 L-2-氨基丁酸产率均大于 99%，且 L-2-氨基丁酸浓度随着底物浓度增加线性上升，当 2-丁酮酸浓度为 20 g/L，产物浓度达到最大，后随着 2-丁酮酸浓度增加 L-2-氨基丁酸产率和转化率均呈下降趋

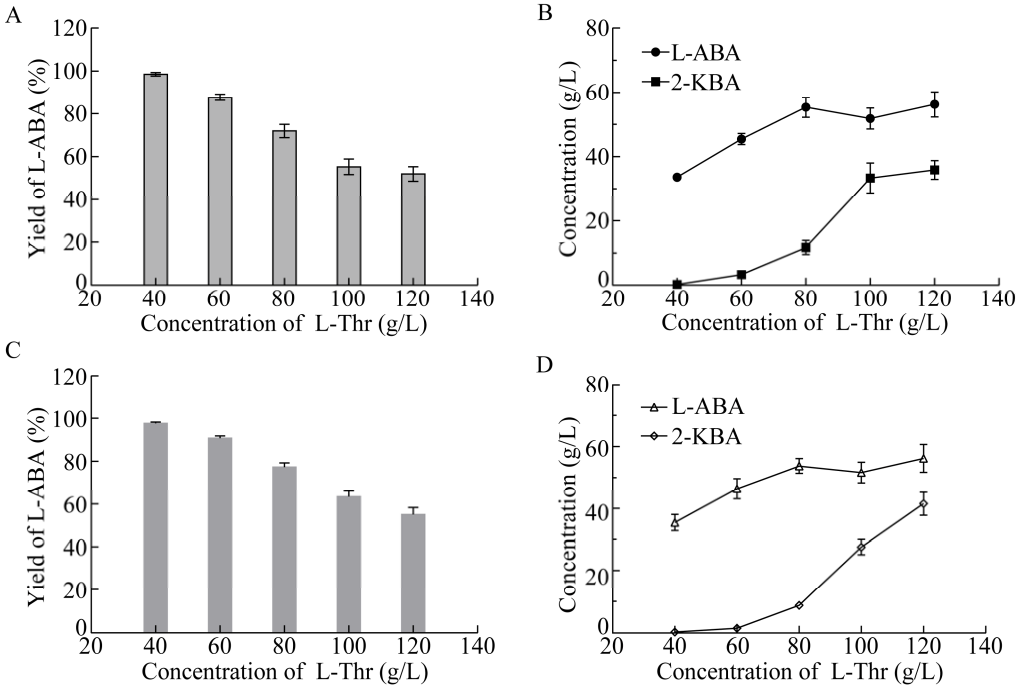

图 5 L-苏氨酸浓度对催化反应影响

Fig. 5 Effect of the concentration of L-Thr on the reaction. (A) Effect of the concentration of L-Thr on the yield of L-ABA in LDH-FDH process. (B) The concentration of L-ABA and 2-KBA with different concentrations of L-threonine after 24 h reaction in LDH-FDH process. (C) Effect of the concentration of L-Thr on the yield of L-ABA in LDH-ADH process. (D) The concentration of L-ABA and 2-KBA with different concentrations of L-threonine after 24 h reaction in LDH-ADH process.

势。表明当 2-丁酮酸浓度大于 20 g/L 时，对 LDH-FDH 及 LDH-ADH 开始出现抑制作用,因此为了尽可能降低 2-丁酮酸抑制作用，应控制反应体系中 2-丁酮酸浓度小于 15 g/L。

2.6 分批补加 L-苏氨酸催化工艺

为了提高上述两种工艺产物浓度及 NAD^+利用率，本文尝试选用分批补加 L-苏氨酸，使生成的 2-丁酮酸及时转化为 L-2-氨基丁酸，解除 2-丁酮酸对酶活性的抑制。按照 1.6.2 方法，LDH-FDH 工艺催化反应进程如图 7A 所示。整个反应过程 2-丁酮酸浓度均控制在 12 g/L 以下，反应 28 h 基本结束，此时 L-2 氨基丁酸浓度达 161.8 g/L,产率大于 97%。按照 1.6.2 方法,LDH-ADH 工艺催化反应进程如图 7B 所示。反应 8 h 2-丁酮酸开始有积累趋势，10 h 已停止补加 L-苏氨酸，反应 10–18 h L-2-氨基丁酸浓度几乎没有增长，而 L-苏氨酸浓度一直维持较低水平，表明 L-TD 活性没有受到抑制；2-丁酮酸消耗速率较慢，表明 LDH-ADH 活性受到抑制，但整个进程 2-丁酮酸未大量积累，排除 2-丁酮酸抑制作用，可能是异丙醇生成丙酮抑制 LDH-ADH 活性。该工艺反应 18 h，L-2 氨基丁酸浓度达 75.7 g/L，产率 79%，转化体系仍残留 17.3 g/L 2-丁酮酸。

2.7 LDH-ADH 工艺进一步优化

添加不同浓度丙酮，按 1.5 方法检测 LDH-ADH 酶活，结果如表 2 所示。当丙酮浓度在 1%–3%范围时,对 LDH-ADH 活性抑制作用较小，当丙酮浓度大于 4%，开始出现明显抑制作用。由图 6B 可知反应 4 h 2-丁酮酸未开始积累，表明 LDH-ADH 活性未受到抑制，此时体系中 L-2-氨基丁酸浓度为 46.5 g/L，丙酮含量约 3%。为了解

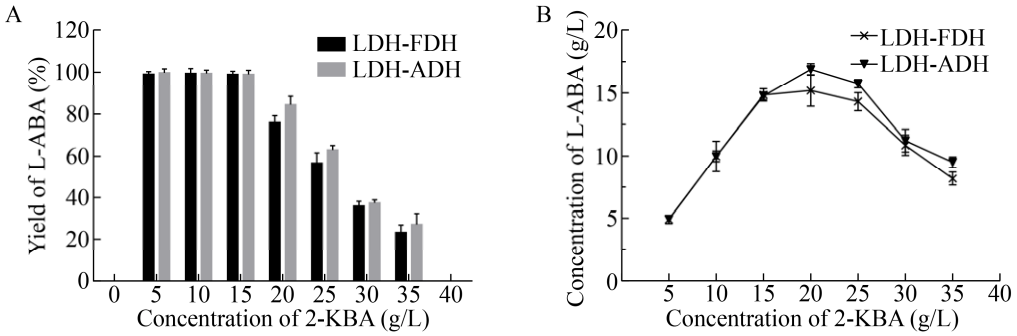

图 6 2-丁酮酸浓度对催化反应影响

Fig. 6 Effect of the concentration of 2-KBA on the reaction. (A) Effect of the concentration of 2-KBA on the yield of L-ABA in two processes. (B) The concentration of L-ABA with different concentrations of 2-KBA after 1 h reaction in two process.

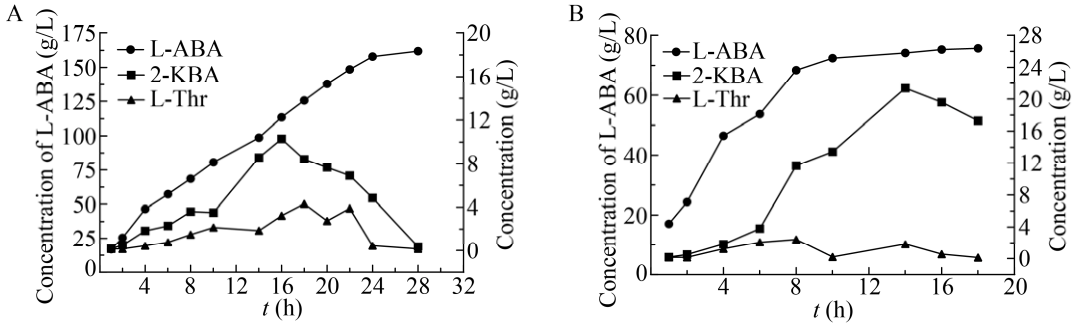

图 7 两种工艺催化反应进程

Fig. 7 Reaction process of two processes. The concentration of L-threonine, 2-ketobutyric acid and L-2-aminobutyric acid was determined by HPLC at different time points. (A) LDH-FDH process. (B) LDH-ADH process.

除丙酮抑制作用，仍按照 1.6.2 的催化工艺进行，每生成约 40 g/L 的 L-2-氨基丁酸，对反应体系抽真空，35 ℃维持 1 h 以去除部分丙酮后，需继续补加 L-苏氨酸，反应进程如图 8 所示。反应 24 h 基本结束，此时 L-2 氨基丁酸浓度达 119.6 g/L，产率大于 98%。

3 讨论

本文将 *ldh* 与 *fdh* 或 *adh* 进行串联共表达获得 LDH-FDH 和 LDH-ADH，并结合 L-TD 对 LDH-FDH 工艺和 LDH-ADH 工艺进行对比优化，合成 L-2-氨基丁酸。LDH-FDH 工艺的最适反应 pH 为 7.5，最适反应温度为 35 ℃，通过加入 50 g/L 甲酸铵、0.3 g/L NAD^+、10% LDH-FDH 粗酶液 (*V*/*V*) 和 7 500 U/L 的 L-TD 酶液，分批补加 L-苏氨酸，控制 2-丁酮酸浓度小于 15 g/L，反应 28 h，实现了 L-2-氨基丁酸的产量为 161.8 g/L，产率 97%。LDH-ADH 工艺的最适 pH 为 8.0，最适反应温度为 35 ℃，通过加入 0.3 g/L NAD^+、10% LDH-ADH 粗酶液 (*V*/*V*) 及 7 500 U/L 的 L-TD 酶液，分批补加 L-苏氨酸及 1.2 倍摩尔量异丙醇，控制 2-丁酮酸浓度小于 15 g/L，且每生成约 40 g/L 的 L-2-氨基丁酸，抽真空去除丙酮，反应 24 h，实现了 L-2-氨基丁酸的产量为 119.6 g/L，产率 98%。

表 2 丙酮浓度对 LDH-ADH 酶活影响

Table 2 Effect of acetone concentration on LDH-ADH activity

Acetone concentration (*V*/*V*) (%)	Activity of LDH-ADH (U/mL)
0	65.1±0.6
1.0	63.5±0.3
2.0	63.8±1.2
3.0	61.2±0.5
4.0	52.8±0.8
5.0	35.0±0.6
6.0	18.9±1.0

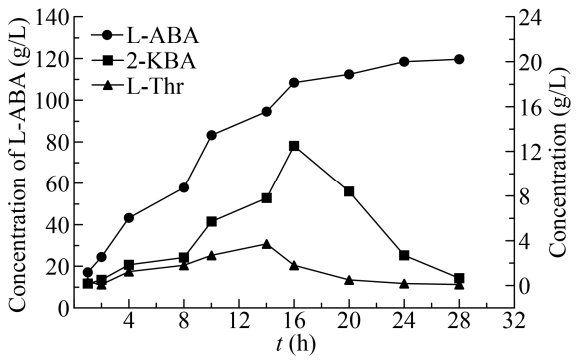

图 8 优化后的 LDH-ADH 工艺催化反应进程

Fig. 8 Reaction process of the reaction by optimizing the process of LDH-ADH.

Tao 等[11]利用甲酸脱氢酶的 NADH 再生系统工艺，在 30 L 反应体系中一次性添加 L-苏氨酸，底物浓度达到 1 mol/L，产物得率 97.3%。Wang 等[16]通过提高 L-苏氨酸脱氨酶的热稳定性以提高 L-2-氨基丁酸产量和 NADH 循环使用次数，产物浓度达 0.993 mol/L。目前相较于甲酸脱氢酶的 NADH 再生系统工艺的报道，本研究考察了不同 2-丁酮酸浓度对 L-2-氨基丁酸转化体系中酶活力的影响，采用分批补加 L-苏氨酸方式降低了 2-丁酮酸对转化体系中酶活力抑制作用，促使 L-2-氨基丁酸产量进一步提高，产物浓度可达 1.57 mol/L，产物得率 97%，工业化潜力极大。目前利用基于醇脱氢酶 NADH 再生系统工艺生产 L-2-氨基丁酸报道较少，且产量普遍较低，难以工业化。刘珊等[17]通过优化酶催化条件，采用异丙醇为底物实现 NADH 再生，产物浓度达 43 g/L，产物得率 99%。本研究从降低 2-丁酮酸与丙酮对酶活力抑制作用着手，采用分批补加 L-苏氨酸及反应过程中抽真空去除丙酮的方式，使 L-2-氨基丁酸产量显著提高，产物浓度达 1.16 mol/L，产物得率 98%，使得该工艺表现出一定的工业化潜力。

笔者对上述两种工艺分别进行 3 000 L 中试放大，均获得良好效果。LDH-FDH 工艺获得 L-2-氨基丁酸的产量高，NAD^+利用率高，但转化结束后，反应体系中会残留约 80 g/L 甲酸盐，产物分离纯化需进行脱盐处理，进而再次回收利用甲酸盐。小试转化反应过程中产生的 CO_2 对反应进程几乎无影响，中试放大过程中需对反应体系通空气以去除产生的 CO_2，若 CO_2 积累浓度过高会抑

制 L-TD 活性。LDH-ADH 工艺获得 L-2-氨基丁酸的产量低于 LDH-FDH 工艺，且 NAD^+利用率低，设备要求高，反应过程中需抽真空除去丙酮，但产物分离纯化无需除盐，较为简单。本文为生物催化制备 L-2-氨基丁酸工业化生产提供了直接的实验数据支持，从生产成本、设备要求等方面考虑，笔者认为 LDH-FDH 工艺更适合工业化。

REFERENCES

[1] Nugent WA, Feaster JE. Practical synthesis of methyl Z-2-(N-acetylamino)but-2-enoate. An intermediate to D- and L-2-aminobutyric acid. Synth Commun, 1998, 28(9): 1617–1623.

[2] Liao JC, Zhang KC, Cho KM. Compositions and methods for the production of L-homoalanine: US, 9550980. 2017-01-24.

[3] Sasa M. A new frontier in epilepsy: novel antiepileptogenic drugs. J Pharmacol Sci, 2006, 100(5): 487–494.

[4] Yin XQ, Sun F, Ge SX. Development of synthesis of α-aminobutyric acid. Fine Chem Intermed, 2010, 40(1): 12–14 (in Chinese).
尹先清, 孙芳, 葛胜祥. α-氨基丁酸化学合成研究进展. 精细化工中间体, 2010, 40(1): 12–14.

[5] Li X. Enzymatic synthesis of L-2-aminobutyric acid and the immobilization of enzyme[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).
李兴. 酶法合成 L-2-氨基丁酸及酶的固定化研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.

[6] Yasukawa K, Hasemi R, Asano Y. Dynamic kinetic resolution of α-aminonitriles to form chiral α-Amino acids. Adv Synth Catal, 2011, 353(13): 2328–2332.

[7] Xu HM, Xia SW, He CL. Preparation of non-natural L amino acids via deracemization of DL-amino acids catalyzed by immobilized D-amino acid oxidase. J Mol Catal, 2012, 26(2): 192–196 (in Chinese).
徐红梅, 夏仕文, 何从林. 固定化 D-氨基酸氧化酶催化 DL-氨基酸去消旋化制备非天然 L-氨基酸. 分子催化, 2012, 26(2): 192–196.

[8] Fotheringham IG, Grinter N, Pantaleone DP, et al. Engineering of a novel biochemical pathway for the biosynthesis of L-2-aminobutyric acid in *Escherichia coli* K12. Bioorg Med Chem, 1999, 7(10): 2209–2213.

[9] Zhu L, Tao RS, Wang Y, et al. Removal of L-alanine from the production of L-2-aminobutyric acid by introduction of alanine racemase and D-amino acid oxidase. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90(3): 903–910.

[10] Ager DJ, Li T, Pantaleone DP, et al. Novel biosynthetic routes to non-proteinogenic amino acids as chiral pharmaceutical intermediates. J Mol Catal B: Enzym, 2001, 11(4/6): 199–205.

[11] 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.

[12] Galkin A, Kulakova L, Yoshimura T, et al. Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(12): 4651–4656.

[13] Krix G, Bommarius AS, Drauz K, et al. Enzymatic reduction of α -keto acids leading to L-amino acids, D- or L-hydroxy acids. J Biotechnol, 1997, 53(1): 29–39.

[14] Zhang CZ, Yang TW, Zhou JP, et al. Whole-cell biotransformation for simultaneous synthesis of L-2-aminobutyric acid and D-gluconic acid in recombinant *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 2028–2034 (in Chinese).
张蔡喆, 杨套伟, 周俊平, 等. 大肠杆菌全细胞转化联产 L-2-氨基丁酸和 D-葡萄糖酸. 生物工程学报, 2017, 33(12): 2028–2034.

[15] Xu JM, Cheng F, Fu FT, et al. Semi-rational engineering of leucine dehydrogenase for *L*-2-aminobutyric acid production. Appl Biochem Biotechnol, 2017, 182(3): 898–909.

[16] Wang Y, Li GS, Qiao P, et al. Increased productivity of L-2-aminobutyric acid and total turnover number of NAD^+/NADH in a one-pot system through enhanced thermostability of L-threonine deaminase. Biotechnol Lett, 2018, 40(11/12): 1551–1559.

[17] Liu S, Li Y, Zhu J. One-pot enzymatic synthesis of L-2-aminobutyric acid coupling with a NADH regeneration system based on ketoreductase. Chin Biotechnol, 2017, 37(1): 64–70 (in Chinese).
刘珊, 李元, 祝俊. 偶联基于酮还原酶的 NADH 再生系统一锅法酶催化合成 L-2-氨基丁酸. 中国生物工程杂志, 2017, 37(1): 64–70.

(本文责编　陈宏宇)