

重组大肠杆菌全细胞转化苹果酸合成丙酮酸

付声亮^{1,2,3}, 邹诗瑶^{1,2,3}, 高 娃^{1,2,3}, 赵 筱^{1,2,3}, 王金华^{1,2,3}, 王永泽^{1,2,3*}

¹ 工业发酵省部共建协同创新中心 武汉 430068

² 湖北省工业微生物重点实验室 武汉 430068

³ 湖北工业大学生物工程与食品学院 武汉 430068

摘要 拟建立一条以苹果酸为原料,通过大肠杆菌全细胞转化获得丙酮酸的合成途径。以大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主,在 pET28a 上共表达内源的苹果酸酶(ME)和来自博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的醛糖还原酶(AR),并对细胞浓度、底物浓度、温度和 pH 值等催化关键因素进行研究。共表达后大肠杆菌苹果酸酶和博伊丁假丝酵母醛糖还原酶酶活分别为(2.8±0.21), (3.1±0.34)U/mL。适宜的催化条件为:细胞浓度 OD_{600nm} 值为 30,底物苹果酸质量浓度为 30 g/L,木糖和苹果酸物质的量比为 1.0,温度为 40 ℃,反应体系 pH 值为 7.8,丙酮酸产量最高可达 23.16 g/L。本研究为生物法合成丙酮酸提供了一种新的方法。

关键词 丙酮酸; 全细胞催化; 苹果酸; 苹果酸酶; 醛糖还原酶

文章编号 1009-7848(2024)07-0219-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.022

丙酮酸, 又称 2-氧代丙酸、 α -酮丙酸或乙酰甲酸,广泛应用于食品、化工、医药和化妆品等领域,因其独特的香味和酸味,以及可以加速脂肪燃烧的特点,故在食品工业中用于制作香精、酸味添加剂、新型膳食补充剂等^[1-2]。

工业上生产丙酮酸主要有化学合成法和生物技术法。化学合成法^[3-4]主要有酒石酸法、乳酸催化氧化法和电化学法,然而化学合成法不仅会造成环境污染,还存在生产成本低和产物纯化困难等缺点。生物技术法生产丙酮酸具有绿色、环保的特点,一直受到研究者的关注,其可进一步分为生物催化法^[5]和微生物发酵法^[6-7]。光滑球拟酵母(*Candida glabrata*)^[6]和大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[7]在微生物发酵法产丙酮酸中扮演重要角色,然而相对于其它有机酸,丙酮酸发酵时糖酸转化率略低^[8],究其原因,丙酮酸作为代谢的重要节点,与许多代谢途径相关联,菌体生长和有机酸积累的矛盾导致丙酮酸无法大量合成,此外,还原力过剩也是影响丙酮酸高效发酵的重要原因^[9]。

相较于微生物直接发酵法,生物催化法合成丙酮酸可克服产物合成和微生物生长竞争这一难

题,具有底物浓度高,生产强度大等优势。目前已有通过过表达乳酸脱氢酶、乳酸氧化酶、丙酮酸脱羧酶和 L-氨基酸脱氨酶等,成功将 D,L-乳酸^[10]、L-乳酸^[11]、D-甘油^[12]、D,L-丙氨酸^[13]转化成丙酮酸的工艺,丙酮酸产量得到很大提升。

相较于乳酸、D-甘油和丙氨酸,苹果酸也有一步转化为丙酮酸的潜力,且理论上大肠杆菌自身具有一定的苹果酸酶活,过表达苹果酸酶后更能高效催化苹果酸,生成对应的丙酮酸,而目前鲜有利用苹果酸合成丙酮酸的研究报道。这可能与苹果酸酶是 NAD(P)⁺依赖型酶,需要考虑还原力失衡的问题有关。

本文探究利用苹果酸生物催化合成丙酮酸的新方法。通过在大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)中共表达来源于大肠杆菌的苹果酸酶(Malic enzyme, ME)和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的醛糖还原酶(Aldose reductase, AR),解决催化反应中的还原力失衡问题,进一步借助细胞浓度、底物浓度和辅酶添加等催化关键影响因子的研究,提高生物合成丙酮酸的效率。所构建重组菌在添加底物 L-苹果酸和辅底物木糖的条件下能产生丙酮酸,为生物法生产丙酮酸提供一条新途径。

收稿日期: 2023-07-06

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31501677)

第一作者: 付声亮,男,硕士生

通信作者: 王永泽 E-mail: wangyongze@hbut.edu.cn

的提取。质粒送至昆泰锐(武汉)生物技术有限公司进行测序验证,将测序结果正确的重组质粒命名为 pET28a(+)-maeB 并化转至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,命名菌株为大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-maeB。

1.2.2 pET28a(+)-AR/maeB 质粒的构建 以质粒 pET28a(+)-AR 为模板,使用反向引物 pET28a(+)-AR-F 和 pET28a(+)-AR-R 对质粒进行线性化,用 DpnI 消化 PCR 产物中的模板后,回收备用,得到长度约为 6 296 bp 的核酸片段。

以质粒 pET28a(+)-maeB 为模板,使用引物 T7/maeB-F 和 T7/maeB-R 进行 T7/maeB 片段的扩增,得到长度约为 2 578 bp 的 T7/maeB 核酸片段。

回收的 T7/maeB 基因片段和线性化质粒 pET28a (+)-AR 按照 1.2.1 节所述克隆流程进行片段处理、化转,并使用引物 AR/maeBYZ-P1 和 AR/maeBYZ-P2 进行克隆子的筛选。将测序正确的质粒命名为 pET28a(+)-AR/maeB,化转至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,命名菌株为大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-AR/maeB。

1.2.3 重组质粒蛋白的表达 将保存在甘油管的重组菌株大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-AR、大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-maeB、大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-AR/maeB 分别在卡那抗性平板上划线活化,连续传代 3 代后,分别挑取大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-AR、大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-maeB 单菌落接种于装有 50 mL 含 50 mg/L 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃,200 r/min 过夜培养作为种子液。再按 1% 的接种量将种子液接种于装有 50 mL 含 50 mg/L 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃,200 r/min 培养至菌体 OD_{600nm} 值为 0.6~0.8 时,添加诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.1 mmol/L,22 ℃,150 r/min,诱导 15 h。取 2 mL 诱导结束后的菌液 4 ℃,8 000 r/min 条件下离心 5 min,用预冷的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=7.4)重悬细胞,超声破胞,4 ℃,8 000 r/min 条件下离心 10 min,弃沉淀,保留上清作为粗酶液。取 10 μL 粗酶液样品进行 SDS-PAGE 电泳,蛋白电泳浓缩胶浓度为 12%,分离胶浓度为 8%。

1.2.4 菌株的酶活测定 醛糖还原酶酶活测定参

照 Jin 等^[14]的方法,苹果酸酶酶活测定参照 Wang 等^[15]的方法,苹果酸酶酶活单位定义为在 40 ℃反应条件下每分钟产生 1 μmol 丙酮酸所需的酶量,醛糖还原酶酶活单位定义为在 40 ℃反应条件下每分钟产生 1 μmol 木糖醇所需的酶量。蛋白浓度采用 Bradford 法测量,标准蛋白选取牛血清白蛋白(BSA)。

1.2.5 全细胞催化剂的制备 挑取大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-AR/maeB 单菌落接种于装有 50 mL 含 50 mg/L 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃,200 r/min 培养至菌体 OD_{600nm} 值为 0.6~0.8 时,添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,22 ℃,150 r/min,诱导 15 h。用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤细胞 3 次,4 ℃,8 000 r/min 离心 5 min,获得菌体沉淀,加入适量无菌水重悬,用于细胞催化。

1.2.6 全细胞催化体系条件及优化

1.2.6.1 菌体量对全细胞转化合成丙酮酸的影响

苹果酸 20 g/L,木糖 23 g/L,反应体系初始 pH 值为 8.0,添加 20 mmol/L MnCl₃^[15],37 ℃,200 r/min,在不同的菌体 OD_{600nm} 值(5,10,20,30,40,50)条件下进行生物转化 24 h。反应结束后,使用 HPLC 分析法检测丙酮酸含量。

1.2.6.2 苹果酸质量浓度对全细胞转化合成丙酮酸的影响 添加不同质量浓度(10,20,30,40,50 g/L)的苹果酸进行催化转化,其它催化条件选取 1.2.6.1 节的最优条件。

1.2.6.3 外源添加辅酶 NADP⁺对全细胞转化合成丙酮酸的影响 外源添加辅酶 NADP⁺(0,25,50,100,150,200 mg/L)进行催化转化,催化体系的其它催化条件选取 1.2.6.2 节的最优条件。

1.2.6.4 木糖和苹果酸物质的量比对全细胞转化合成丙酮酸的影响 在不同的木糖和苹果酸物质的量比(0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4)条件下进行催化转化,催化体系的其它催化条件选取 1.2.6.3 节的最优条件。

1.2.6.5 温度对全细胞转化合成丙酮酸的影响 在不同的温度(25,30,35,37,40,45,50,55 ℃)条件下进行催化转化,催化体系的其它条件选取 1.2.6.4 节的最优条件。

1.2.6.6 pH 对全细胞转化合成丙酮酸的影响 在

不同的反应体系初始 pH 值(7.0,7.5,7.8,8.0,8.5,9.0,9.5,10.0)条件下进行催化转化,催化体系的其它条件选取 1.2.6.5 节的最优条件。

1.2.7 HPLC 分析法检测丙酮酸 催化反应液首先 12 000 r/min 离心 5 min,按要求稀释一定倍数后,0.22 μm 滤膜过滤。色谱柱选取 Bio-Rad HPX 87H,流动相为 4 mmol/L H_2SO_4 水溶液,流速为 0.4 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,进样体积为 10 μL ,检测器为 PDA。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET28a(+)-AR/maeB 的成功构建

所构建的重组质粒 pET28a (+)-AR/maeB 的示意图见图 1。

2.2 重组质粒蛋白表达的结果

粗酶液 SDS-PAGE 电泳结果如图 2 所示。重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR、大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-maeB、大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR/maeB 经过 IPTG 诱导后,有明显的蛋白表达条带(泳道 6、泳道 7、泳道 8),而对应未添加 IPTG 诱导表达的对照组(泳道 2、泳道 3、泳道 4)在相应的位置蛋白表达条带很淡,可初步推断醛糖还原酶、苹果酸酶的分子质量大小分别为 39 ku 和 83 ku。

2.3 酶活测定结果

酶活测定如表 2 所示。苹果酸酶粗酶液酶活为 $(3.0\pm0.83)\text{U/mL}$,醛糖还原酶粗酶液酶活为 $(3.2\pm0.62)\text{U/mL}$,共表达体系中苹果酸酶粗酶液酶活为 $(2.8\pm0.21)\text{U/mL}$,共表达体系中醛糖还原酶粗酶液酶活为 $(3.1\pm0.34)\text{U/mL}$ 。结果表明在大肠杆菌中共表达来源于大肠杆菌的苹果酸酶和博伊丁假丝酵母的醛糖还原酶是可行的,具有与单独表达的苹果酸酶和醛糖还原酶相近的活性。

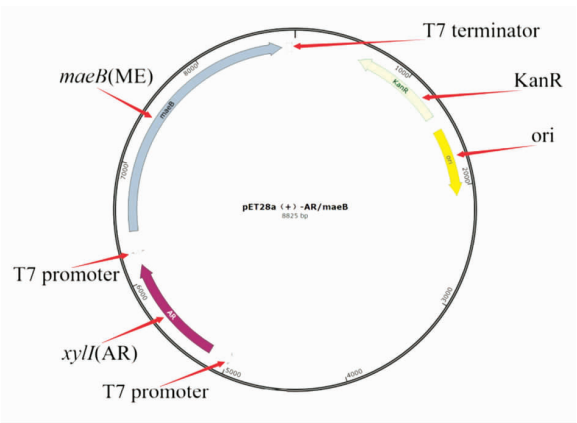
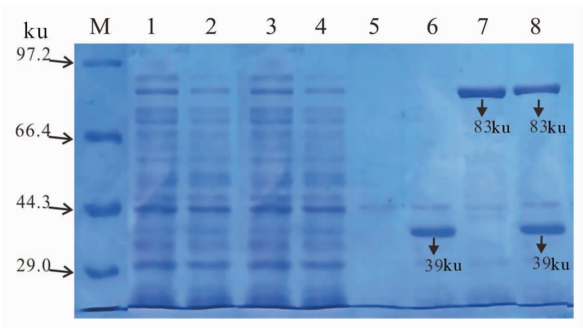


图 1 pET28a(+)-AR/maeB 质粒图谱

Fig.1 Plasmid profile of pET28a(+)-AR/maeB



注:M;maker;泳道 1:大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+),无 IPTG 诱导;泳道 2:大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR,无 IPTG 诱导;泳道 3:大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-maeB,无 IPTG 诱导;泳道 4:大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR/maeB,无 IPTG 诱导;泳道 5:大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR 经 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导;泳道 6:大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR 经 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导;泳道 7:大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-maeB 经 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导;泳道 8:大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR/maeB 经 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导。

图 2 重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR/maeB 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE of BL21(DE3)/pET28a(+)-AR/maeB expression products

表 2 酶活测定结果			
Table 2 Results of enzyme activity determination			
菌株	酶	添加 IPTG 诱导酶活/ (U/mL)	不添加 IPTG 诱导酶活/ (U/mL)
大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR	AR	3.2 \pm 0.62	0.04 \pm 0.03
大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-maeB	ME	3.0 \pm 0.83	0.06 \pm 0.02
大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR/maeB	AR	3.1 \pm 0.34	0.07 \pm 0.03
大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-AR/maeB	ME	2.8 \pm 0.21	0.05 \pm 0.01

2.4 全细胞催化体系的优化

2.4.1 菌体量对全细胞转化合成丙酮酸的影响

菌体浓度在生物催化或生物转化中扮演者重要角色,菌体浓度越高,能够提供更多的酶进行转化合成,催化速率就会越快^[16]。当菌体 OD_{600nm} 值从 5 增加到 30, 丙酮酸产量逐渐增加, 在菌体 OD_{600nm} 值为 30 时达到最大, 产量为 13.42 g/L, 随着菌体 OD_{600nm} 值从 30 增加到 40, 丙酮酸产量没有明显变化(图 3)。类似的现象也常发生在其它大肠杆菌生物催化反应中, 如邵宇等^[17]研究了菌体 OD_{600nm} 值在 10~50 范围内对全细胞转化合成 *L*-苯乳酸的影响, 发现随着菌体量的增加, *L*-苯乳酸产量也逐渐增加, 菌体 OD_{600nm} 值超过 30 时, *L*-苯乳酸产量没有明显变化。潘珊等^[18]研究了菌体 OD_{600nm} 值在 10~60 范围内对全细胞转化合成 *D*-甘露醇的

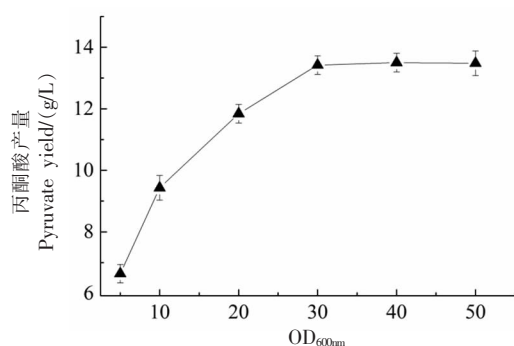


图3 不同菌体量对全细胞转化合成丙酮酸的影响

Fig.3 Effect of different cell mass on whole-cell biotransformation of pyruvate

2.4.3 外源添加辅酶 NADP⁺对全细胞转化合成丙酮酸的影响 苹果酸酶是 NADP⁺依赖型酶, 理论上外源添加辅酶 NADP⁺可以提高全细胞催化体系中苹果酸酶的活力, 从而提高丙酮酸的生产效率。如图 5 所示, 额外添加质量浓度为 0~200 mg/L 的辅酶 NADP⁺几乎不影响丙酮酸产量。这可能是因为外源添加的辅酶 NADP⁺无法透过细胞膜进入到细胞内部发挥作用^[20]。

2.4.4 木糖和苹果酸物质的量比对全细胞转化合成丙酮酸的影响 为了达到平衡苹果酸酶和醛糖还原酶的催化效果, 实现辅酶 NADP⁺供给平衡, 控制苹果酸质量浓度为 30 g/L, 调整了木糖和苹果酸的物质的量比, 来观察全细胞转化合成丙酮酸

影响, 也发现菌体 OD_{600nm} 值超过 30 时, *D*-甘露醇产量却逐渐减少, 这些都表明大肠杆菌菌体浓度过高可能会带来一定传质阻力。

2.4.2 苹果酸浓度对全细胞转化合成丙酮酸的影响 生物催化中底物添加量对催化效果往往也有着深刻的影响。如图 4 所示, 丙酮酸产量随着底物质量浓度的增加而增加, 当底物质量浓度为 30 g/L 时, 达到最大, 丙酮酸产量为 21.61 g/L, 然而当底物质量浓度进一步增加时, 丙酮酸产量没有明显变化。考虑到已经将苹果酸中和成盐, 排除了 H⁺离子的干扰, 而高浓度的苹果酸仍对催化体系有一定抑制作用, 推测可能是苹果酸根对细胞存在一定的影响, 很多情况下酸根都会对细胞起一定抑制作用, 从而降低催化发酵效果^[19]。

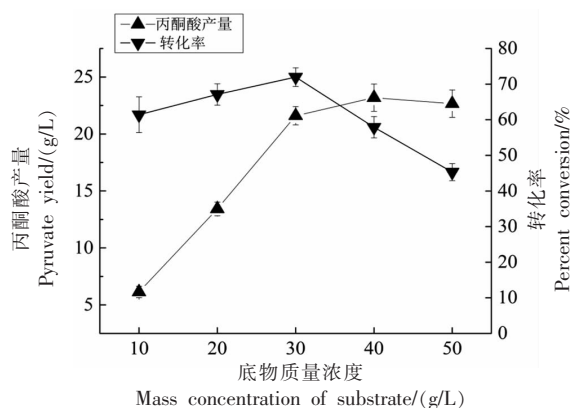


图4 底物质量浓度对全细胞转化合成丙酮酸的影响

Fig.4 Effect of substrate mass concentration on whole-cell biotransformation of pyruvate

的影响。如图 6 所示, 随着木糖和苹果酸物质的量比从 0.2 增加到 1.0, 丙酮酸产量也随之增加, 在木糖和苹果酸物质的量比为 1.0 时达到最大, 丙酮酸产量为 21.60 g/L, 而当物质的量比进一步增加时, 丙酮酸产量没有明显变化。

2.4.5 温度对全细胞转化合成丙酮酸的影响 温度会直接影响反应体系中酶的活力, 从而影响丙酮酸产量。如图 7 所示, 从 25~40 °C。丙酮酸产量随着反应温度的升高而增加, 当温度为 40 °C 时, 达到最大, 丙酮酸产量为 22.53 g/L, 然而当温度进一步提高时, 丙酮酸产量开始下降(图 7)。

2.4.6 pH 对全细胞转化合成丙酮酸的影响 反应体系中的 pH 通过影响酶促反应速度从而影响

丙酮酸产量。如图8所示,丙酮酸产量在pH值为7.8时达到最大,产量为23.17 g/L。苹果酸酶的最适pH值为7.8^[9],醛糖还原酶的最适pH值为7.5^[21]。适用于全细胞催化的最适pH,恰好为苹果酸酶的

最适pH,提示在双酶偶联法的生物催化体系中,苹果酸酶的酶活仍然相对不足,需要调整整个催化体系的pH值来满足苹果酸酶的需求。

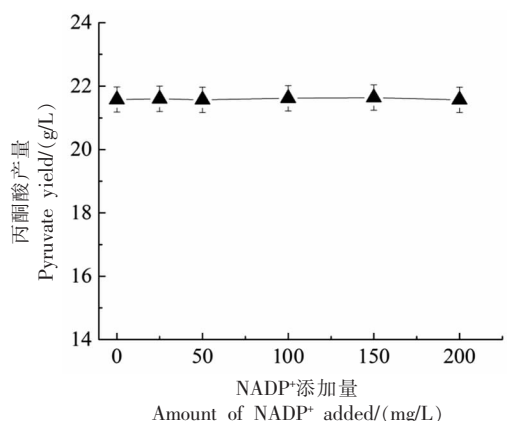


图5 外源添加辅酶NADP⁺对全细胞转化合成丙酮酸的影响

Fig.5 Effect of exogenous coenzyme NADP⁺ addition on whole-cell biotransformation of pyruvate

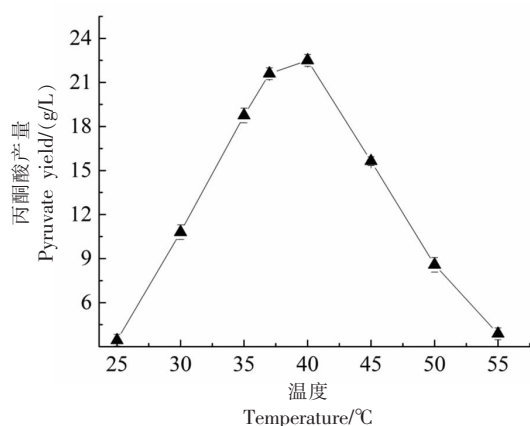


图7 不同反应温度对全细胞转化合成丙酮酸的影响

Fig.7 Effect of reaction temperature on whole-cell biotransformation of pyruvate

3 讨论与结论

丙酮酸是重要的化学中间体,相较于微生物发酵法,生物催化法合成丙酮酸可克服产物合成和微生物生长竞争这一难题,一般具有底物浓度高,生产强度大等优势。近年来,已有不少研究通过生物催化的方式将D,L-乳酸、L-乳酸、D-甘油、D,L-丙氨酸转化成丙酮酸,丙酮酸产量和转化率得到很大的提升(表3)。

分析代谢途径,发现苹果酸也能直接转化为

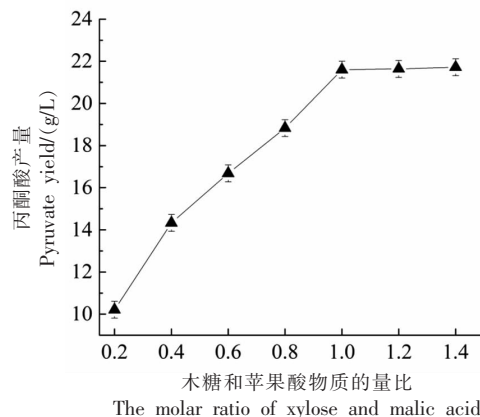


图6 木糖和苹果酸物质的量比对全细胞转化合成丙酮酸的影响

Fig.6 Effect of molar ratio of xylose to malic acid on whole-cell biotransformation of pyruvate

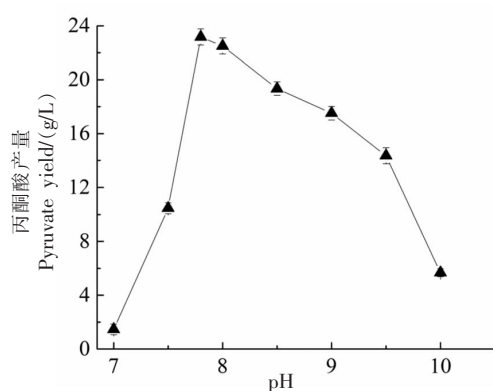


图8 pH值对全细胞转化合成丙酮酸的影响

Fig.8 Effect of pH value on whole-cell biotransformation of pyruvate

丙酮酸,而催化这一反应过程的酶是苹果酸酶,考虑到大肠杆菌的苹果酸酶的生理功能得到了深入的研究^[22],且大肠杆菌在有机酸发酵和催化上有着广泛的应用^[7,11],因此本研究拟构建一条由大肠杆菌为宿主,苹果酸为底物的丙酮酸合成途径。

在生物催化方法中,适宜酶的选择起着非常重要的作用。在大肠杆菌中有着内源的苹果酸酶,选择内源酶可避免异源表达中存在着信号肽选择、密码子优化及蛋白质修饰等问题,过表达的成

表 3 生物催化法合成丙酮酸研究
Table 3 Study on biocatalytic synthesis of pyruvate

酶	底物	产量/(g/L)	转化率/%
斯氏假单胞菌(<i>Pseudomonas stutzeri</i> SDM)的乳酸脱氢酶	<i>D,L</i> -乳酸	48.4	98 ^[10]
浅绿气球菌(<i>Aerococcus viridans</i>)的 <i>L</i> -乳酸氧化酶和嗜热球形脲芽孢杆菌(<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>)的过氧化氢酶	<i>L</i> -乳酸	59.9	90.8 ^[11]
解脲副伤寒杆菌(<i>Paracaligenes ureilyticus</i>)的脱水酶	<i>D</i> -甘油	11.2	97 ^[12]
奇异变形杆菌(<i>Proteus mirabilis</i>)的 <i>L</i> -氨基酸脱氨酶	<i>D,L</i> -丙氨酸	43.5	79.99 ^[13]
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)的苹果酸酶	苹果酸	23.17	77.2

功率往往较高。还要注意的,大肠杆菌的苹果酸酶由 *maeA* 基因编码或 *maeB* 基因编码^[22],*maeB* 基因编码的苹果酸酶与 *maeA* 基因编码的苹果酸酶相比,对苹果酸亲和性更强^[23],因此本研究选择 *maeB* 基因编码的苹果酸酶用于生产丙酮酸。然而苹果酸酶(*maeB*)催化苹果酸氧化生成丙酮酸的过程需要辅因子 NADP⁺,NADP⁺价格昂贵,这会加大生产成本,构建 NADP⁺辅酶再生系统是解决这一问题的最佳方式。酶法偶联是 NADP⁺辅酶再生的常用方式之一^[24]。NADPH 依赖型酶有甲酸脱氢酶^[25]、谷胱甘肽还原酶^[26]、醛糖还原酶^[27]、羰基还原酶^[28]等,本研究选用博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的醛糖还原酶(AR),该酶能催化木糖合成木糖醇并消耗大量的 NADPH 来实现 NADP⁺的再生,以往研究发现,该酶在体内发酵或者催化合成木糖醇表现较高的活性^[27],因此在这里配对苹果酸酶进行酶偶联催化,实现丙酮酸的催化合成。

在构建表达这 2 个酶的载体时,选用了单质粒的催化模式。尽管现在利用大肠杆菌催化转化时,也有采用双质粒^[29]甚至三质粒的体系^[30],1 个质粒表达 1 个酶,这样的好处是可单独调节酶的活性,即可通过调整质粒的拷贝数,也可通过每个质粒选择不同启动子、RBS 位点或者 5'UTR 区来调控每个酶的翻译效率,可以灵活控制酶的表达来协调偶联表达的 2 个酶的活力。然而,双质粒法往往需要多个抗性基因来维持质粒的存在,给大肠杆菌带来了更多的负荷而影响到催化。在其它生物催化合成丙酮酸的相关研究中^[11,31],也发现单质粒是一个比较可靠的选择,在本研究中,发现在单质粒上,两个酶在蛋白电泳时都可见清晰的表达条带,并且在单质粒上的苹果酸酶和醛糖还原酶也都表现出较高的酶活力(表 2),表明偶联表

达在单质粒是一个可行的选项。

此外,细胞浓度以及底物浓度是影响丙酮酸产量常见的 2 个因素,研究发现菌体 OD_{600nm} 为 30 时,丙酮酸产量最高,苹果酸质量浓度为 30 g/L 时最佳。

辅酶 NADP⁺平衡也是影响催化体系生产丙酮酸的关键因素,本文尝试从辅底物浓度和外源添加辅酶 NADP⁺两个方面入手来提高丙酮酸合成效率。结果发现辅底物和底物物质的量比为 1.0 最佳。从底物供给平衡角度来看,1 分子苹果酸转化为丙酮酸消耗 1 分子辅酶 NADP⁺,而转化 1 分子木糖则生成 1 分子辅酶 NADP⁺,苹果酸和木糖的物质的量比相等正好能实现催化的原料供需平衡,然而从动力学角度来看,底物的质量浓度以及酶的活性是辅酶供给平衡的直接决定因素。考虑到苹果酸和木糖分子质量接近,即 2 个底物质量浓度也大致相等,表明在木糖和苹果酸物质的量比为 1.0 时,辅酶供给平衡也有可能实现,从而达到最大丙酮酸产量。而这并不意味着双酶法催化时,2 个底物物质的量比必须满足等于 1 的条件,因为催化体系中底物的分子质量和酶活情况都有差异,如 Jin 等^[14]构建的醛糖还原酶和葡萄糖脱氢酶偶联体系中底物与辅底物物质的量比为 0.8 时,即可满足反应需求。

全细胞催化的效果,在很大程度上和催化相关的 2 个酶的酶活力有关。苹果酸酶的最适反应温度为 46 ℃,在 40~50 ℃ 范围内,活性能维持在 80%以上^[15],醛糖还原酶的最适反应温度为 30 ℃,醛糖还原酶在 30~40 ℃ 范围内,活性能维持在 60%以上^[14]。因此,在双酶偶联催化体系中,最适反应温度可以通过协调 2 个酶的活力获得,在本研究中,40 ℃ 恰好处于 2 个酶最适催化温度之间。此

外,适用于全细胞催化的最适 pH,恰好为苹果酸酶的最适 pH,提示在双酶偶联法的生物催化体系中,苹果酸酶的酶活相对不足。

综上所述,得出如下结论:

1) 通过大肠杆菌 *maeB* 基因编码的苹果酸酶(ME)和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的醛糖还原酶(AR)偶联表达,可实现由苹果酸生物转化为丙酮酸。

2) 外源添加 0~200 mg/L 辅酶 NADP⁺对丙酮酸产量酶没有积极促进作用,木糖和苹果酸物质的量比为 1.0 时,丙酮酸产量最高。

3) 菌体 OD_{600nm} 值为 30, 底物苹果酸质量浓度为 30 g/L, 催化体系温度为 40 ℃, pH 值为 7.8 时,丙酮酸产量最高,可达 23.17 g/L。

参 考 文 献

- [1] CYBULSKI K, TOMASZEWSKA-HETMAN L, RAKICKA M, et al. Production of pyruvic acid from glycerol by *Yarrowia lipolytica*[J]. Folia Microbiologica, 2019, 64(6): 809-820.
- [2] YIN C Y, LI X L, CHEN Z X, et al. Sustainable production of pyruvic acid: Oxidative dehydrogenation of lactic acid over the FeMoO/P catalyst[J]. New Journal of Chemistry, 2020, 44(15): 5884-5894.
- [3] LUO Z S, LIU S, DU G C, et al. Enhanced pyruvate production in *Candida glabrata* by carrier engineering[J]. Biotechnol Bioeng, 2018, 115(2): 473-482.
- [4] XIXI Z, QIAN P, WANG B Y. Electrolyzing lactic acid in situ in fermentation broth to produce pyruvic acid in electrolysis cell[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(10): 4045-4052.
- [5] PAL D, KESHAV A, MAZUMDAR B, et al. Production and recovery of pyruvic acid: Recent advances[J]. Journal of The Institution of Engineers (India): Series E, 2017, 98(2): 165-175.
- [6] LUO Z S, ZENG W Z, DU G C, et al. Enhancement of pyruvic acid production in *Candida glabrata* by engineering hypoxia-inducible factor 1[J]. Bioreour Technol, 2020, 295(1): 122248.
- [7] MALEKI N, SAFARI M, EITEMAN M A. Conversion of glucose-xylose mixtures to pyruvate using a consortium of metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Engineering in Life Sciences, 2018, 18(1): 40-47.
- [8] LU Q Y, SHAN X Y, ZENG W Z, et al. Production of pyruvic acid with *Candida glabrata* using self-fermenting spent yeast cell dry powder as a seed nitrogen source[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9(1): 1-10.
- [9] QIN Y, JOHNSON C H, LIU L, et al. Introduction of heterogeneous NADH reoxidation pathways into *Torulopsis glabrata* significantly increases pyruvate production efficiency[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2011, 28(4): 1078-1084.
- [10] GAO C, QIU J H, MA C Q, et al. Efficient production of pyruvate from DL-lactate by the lactate-utilizing strain *Pseudomonas stutzeri* SDM[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40755.
- [11] LI G, LIAN J, XUE H, et al. Enzymatic preparation of pyruvate by a whole-cell biocatalyst co-expressing L-lactate oxidase and catalase[J]. Process Biochemistry, 2020, 96(9): 113-121.
- [12] SUTIONO S, TESHIMA M, BEER B, et al. Enabling the direct enzymatic dehydration of D-glycerate to pyruvate as the key step in synthetic enzyme cascades used in the cell-free production of fine chemicals[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(5): 3110-3118.
- [13] LIU K, GONG M Y, LV X Q, et al. Biotransformation and chiral resolution of D, L-alanine into pyruvate and d-alanine with a whole-cell biocatalyst expressing L-amino acid deaminase[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2020, 67(4): 668-676.
- [14] JIN L Q, XU W, YANG B, et al. Efficient biosynthesis of xylitol from xylose by coexpression of xylose reductase and glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 187(4): 1143-1157.
- [15] WANG B J, WANG P, ZHENG E X, et al. Biochemical properties and physiological roles of NADP-dependent malic enzyme in *Escherichia coli* [J]. Journal of Microbiology, 2011, 49(5): 797-802.
- [16] LI H X, SUN T Y, JIA M Y, et al. Production of gamma-aminobutyric acid by *Levilactobacillus brevis* CD0817 by coupling fermentation with self-buffered whole-cell catalysis[J]. Fermentation, 2022, 8(7): 321-333.
- [17] 邵宇, 张显, 胡孟凯, 等. 重组大肠杆菌全细胞催

- 化合成 *L*-苯乳酸[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 1-8.
- SHAO Y, ZHANG X, HU M K, et al. Synthesis of *L*-phenyllactic acid catalyzed by recombinant *Escherichia coli* whole cell biotransformation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(14): 1-8.
- [18] 潘珊, 胡孟凯, 潘学玮, 等. 基于双酶级联协调表达策略高效催化合成 *D*-甘露醇[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2549-2565.
- PAN S, HU M K, PAN X W, et al. Efficient biosynthesis of *D*-mannitol by coordinated expression of a two-enzyme cascade[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2549-2565.
- [19] WEI Z H, XU Y X, XU Q T, et al. Microbial Biosynthesis of *L*-malic acid and related metabolic engineering strategies: Advances and prospects[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9(2): 765685.
- [20] 肖黎, 王亚军, 曹政, 等. 生物催化法合成 6-氰基-(3R,5R)-二羟基己酸叔丁酯[J]. 生物加工过程, 2013, 11(1): 29-34.
- XIAO L, WANG Y J, CAO Z, et al. Development of biocatalytic process for *t*-butyl 6-cyano-(3R,5R)-dihydroxylhexanoate[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2013, 11(1): 29-34.
- [21] KHOURY G A, FAZELINIA H, CHIN J W, et al. Computational design of *Candida boidinii* xylose reductase for altered cofactor specificity[J]. Protein Science, 2009, 18(10): 2125-2138.
- [22] BOLOGNA F P, ANDREO C S, DRINCOVICH M F. *Escherichia coli* malic enzymes: Two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure[J]. J Bacteriol, 2007, 189(16): 5937-5946.
- [23] KHANDELWAL R, SRIVASTAVA P, BISARIA V S. Expression of *Escherichia coli* malic enzyme gene in *Zymomonas mobilis* for production of malic acid[J]. Journal of Biotechnology, 2022, 351(9): 23-29.
- [24] LEE Y S, GERULSKIS R, MINTEER S D. Advances in electrochemical cofactor regeneration: Enzymatic and non-enzymatic approaches[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 73(1): 14-21.
- [25] FOGAL S, BENEVENTI E, CENDRON L, et al. Structural basis for double cofactor specificity in a new formate dehydrogenase from the acidobacterium *Granulicella mallensis* MP5ACTX8[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(22): 9541-9554.
- [26] ANGELASTRO A, DAWSON W M, LUK L Y P, et al. A versatile disulfide-driven recycling system for NADP⁺ with high cofactor turnover number[J]. ACS Catalysis, 2017, 7(2): 1025-1029.
- [27] 唐梅, 蔡松, 付声亮, 等. *UdhA* 和博伊丁假丝酵母 *xyII* 基因共表达对木糖醇发酵的影响[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(1): 106-109.
- TANG M, CAI S, FU S L, et al. The effect of co-expression of *UdhA* and *Candida boidinii xyII* gene on xylitol fermentation[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(1): 106-109.
- [28] WU X R, GOU X D, CHEN Y J. Enzymatic preparation of *t*-butyl-6-cyano-(3R, 5R)-dihydroxyhexanoate by a whole-cell biocatalyst co-expressing carbonyl reductase and glucose dehydrogenase[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(1): 104-110.
- [29] 贾园园, 李祥, 张振华, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化 *D*, *L*-扁桃酸对映选择性制备 *L*-苯甘氨酸[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 83-89.
- JIA Y Y, LI X, ZHANG Z H, et al. Enantioselective *L*-phenylglycine production from *D*, *L*-mandelic acid using engineered *Escherichia coli* whole-cells[J]. Food Science, 2021, 42(2): 83-89.
- [30] BLOCH S E, SCHMIDT-DANNERT C. Construction of a chimeric biosynthetic pathway for the de novo biosynthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli*[J]. Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology, 2014, 15(16): 2393-2401.
- [31] EISENBERG A, SEIP J E, GAVAGAN J E, et al. Pyruvic acid production using methylotrophic yeast transformants as catalyst[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1997, 2(4): 223-232.

Biosynthesis of Pyruvate from Malic Acid by Whole-cell Biotransformation Using Recombinant *Escherichia coli*

Fu Shengliang^{1,2,3}, Zou Shiyao^{1,2,3}, Gao Wa^{1,2,3}, Zhao Xiao^{1,2,3}, Wang Jinhua^{1,2,3}, Wang Yongze^{1,2,3*}

(¹Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation (Ministry of Education & Hubei Province), Wuhan 430068

²Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Wuhan 430068

³Hubei University of Technology, School of Bioengineering and Food Science, Wuhan 430068)

Abstract It is proposed to establish a synthetic route of pyruvate obtained from malic acid by whole cell biotransformation using *Escherichia coli*. With *Escherichia coli* BL21 (DE3) as the host, endogenous malice enzyme (ME) and aldose reductase (AR) from *Candida boidinii* were co-overexpressed on pET28a, and catalytic key factors such as cell concentration, substrate concentration, temperature and pH were investigated. Activities of malic enzyme from *Escherichia coli* and aldose reductase from *Candida boidinii* were (2.8±0.21), (3.1±0.34) U/mL respectively. The suitable catalytic conditions were as follows, the cell concentration of bacterial OD_{600nm} value was 30, the mass concentration of substrate malic acid was 30 g/L, the molar ratio of xylose to malic acid was 1.0, temperature was 40 °C, the pH value of the reaction system was 7.8, pyruvate yield was up to 23.16 g/L. This study provides a new method for the biological production of pyruvate.

Keywords pyruvate; whole cell catalysis; malic acid; malic enzyme; xylose reductase