

• 工业生物技术 •

重组大肠杆菌全细胞催化 L-苏氨酸合成 2,5-二甲基吡嗪

于海波¹, 徐建中¹, 刘立明^{1,2}, 张伟国¹

1 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

2 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

于海波, 徐建中, 刘立明, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化 L-苏氨酸合成 2,5-二甲基吡嗪. 生物工程学报, 2021, 37(1): 228-241.
Yu HB, Xu JZ, Liu LM, et al. Biosynthesis of 2,5-dimethylpyrazine from L-threonine by whole-cell biocatalyst of recombinant *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 228-241.

摘要: 2,5-二甲基吡嗪 (2,5-dimethylpyrazine, 2,5-DMP) 在食品香料与医药方面具有重要的经济价值, 工业上普遍采用环境不友好且反应条件苛刻的化学合成法来生产。文中结合代谢工程和辅因子工程策略设计高效催化 L-苏氨酸合成 2,5-DMP 的全细胞催化剂, 实现微生物转化法合成 2,5-DMP。本研究首先分析了不同微生物来源的苏氨酸脱氢酶 (Threonine dehydrogenase, TDH) 对 2,5-DMP 合成的影响, 发现来源于大肠杆菌 *Escherichia coli* 中 *EcTDH* 具有最佳的催化能力, 2,5-DMP 产量达到 (438.3±23.7) mg/L。随后结合辅因子工程, 通过引入乳脂链球菌 *Lactococcus cremoris* 中 NADH 氧化酶 (NADH oxidase, *LcNoxE*) 并优化其表达方式发现通过融合表达 *EcTDH* 和 *LcNoxE* 可平衡胞内 NADH/NAD⁺ 水平, 维持较高细胞存活率, 进一步提高 2,5-DMP 产量。最后, 通过阻断合成 2,5-DMP 的支路代谢途径, 可以显著减少副产物积累, 增加 2,5-DMP 产量, 同时提高 L-苏氨酸转化率。最终获得的重组菌 *EcΔkΔAΔBΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-PSstT* 在含有 5 g/L L-苏氨酸的转化体系中于 37 °C、200 r/min 孵化 24 h, 可积累 (1 095.7±81.3) mg/L 的 2,5-DMP, L-苏氨酸转化率达到 76%, 产物得率为 0.288 g/(g L-苏氨酸)。因此, 文中构建的重组菌可以实现高效催化 L-苏氨酸合成 2,5-DMP, 具有一定的工业应用潜力。

关键词: 2,5-二甲基吡嗪, L-苏氨酸, 全细胞催化, *EcTDH-LcNoxE* 融合蛋白, L-苏氨酸转运蛋白 *SstT*, 辅因子工程

Biosynthesis of 2,5-dimethylpyrazine from L-threonine by whole-cell biocatalyst of recombinant *Escherichia coli*

Haibo Yu¹, Jianzhong Xu¹, Liming Liu^{1,2}, and Weiguo Zhang¹

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

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

Abstract: 2,5-dimethylpyrazine (2,5-DMP) is of important economic value in food industry and pharmaceutical industry,

Received: May 12, 2020; **Accepted:** August 13, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31601459).

Corresponding author: Jianzhong Xu. Tel/Fax: +86-510-85329312; E-mail: xujianzhong@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31601459) 资助。

and is now commonly produced by chemical synthesis. In this study, a recombinant *Escherichia coli* high-efficiently converting L-threonine to 2,5-DMP was constructed by combination of metabolic engineering and cofactor engineering. To do this, the effect of different threonine dehydrogenase (TDH) on 2,5-DMP production was investigated, and the results indicate that overexpression of *Ec*TDH in *E. coli* BL21(DE3) was beneficial to construct a 2,5-DMP producer with highest 2,5-DMP production. The recombinant strain *E. coli* pRSFDuet-*tdh*_{Ec} produced (438.3±23.7) mg/L of 2,5-DMP. Furthermore, the expression mode of NADH oxidase (NoxE) from *Lactococcus cremoris* was optimized, and fusion expression of *Ec*TDH and *Lc*NoxE led to balance the intracellular NADH/NAD⁺ level and to maintain the high survival rate of cells, thus further increasing 2,5-DMP production. Finally, the accumulation of by-products was significantly decreased because of disruption of shunt metabolic pathway, thereby increasing 2,5-DMP production and the conversion ratio of L-threonine. Combination of these genetic modifications resulted in an engineered *E. coli* $\Delta kbl \Delta tynA \Delta tdcB \Delta ilvA$ pRSFDuet-*tdh*_{Ec}-*noxE*_{Lc}-*PstT* (*Ec* $\Delta k\Delta A\Delta B\Delta A/$ *TDH*_{Ec}-*NoxE*_{Lc}-*PStT*) capable of producing (1 095.7±81.3) mg/L 2,5-DMP with conversion ratio of L-threonine of 76% and a yield of 2,5-DMP of 28.8% in 50 mL transformation system with 5 g/L L-threonine at 37 °C and 200 r/min for 24 h. Therefore, this study provides a recombinant *E. coli* with high-efficiently catalyzing L-threonine to biosynthesize 2,5-DMP, which can be potentially used in biosynthesis of 2,5-DMP in industry.

Keywords: 2,5-dimethylpyrazine, L-threonine, whole-cell biocatalyst, *Ec*TDH-*Lc*NoxE fusion protein, L-threonine transporter *SstT*, cofactor engineering

2,5-二甲基吡嗪 (2,5-dimethylpyrazine, 2,5-DMP), 呈强烈的炒花生香气和巧克力、奶油气味, 是一种重要的香味化合物和药物中间体, 广泛存在于咖啡、花生等 50 多种天然食品中^[1]。作为食品香料时, 只添加 1–2 mg/L 的 2,5-DMP 就可起到明显的增香作用, 是国标 GB2760-86 规定为允许使用的香精^[2]。此外, 2,5-DMP 还是合成第二代磺脲类降血糖药格列吡嗪、新一代长效降血脂药阿昔莫司 (Acipimox) 以及治疗结核病的有效药物 5-甲基吡嗪-2-羧酸甲酯 (Pyrazinoic acid esters, PAE) 等一系列药物的原料或药物中间体^[3]。因此, 摸索 2,5-DMP 经济高效的生产方法无疑是非常重要的。

2,5-DMP 的生产方法主要有提取法、化学合成法和微生物转化法, 其中化学合成法是目前工业上普遍采用的生产方法^[4]。需要指出的是, 化学合成过程中所用的原料和催化剂以及形成的副产物具有一定的毒性, 会对人和环境造成一定的危害^[5]。微生物合成法相对于化学合成法有着反应条件温和和环境友好等优点, 却报道较少, 仅仅止步于利用未经选育的野生型菌株, 通过添加高浓度 L-苏氨酸并优化培养条件进行生物转化。例如, Gros JB 团队利用富含 L-苏氨酸的大豆固体

培养基培养枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* IFO 3013 生产 2,5-DMP^[4,6]。近年来, 研究者普遍认为 L-苏氨酸是生物合成 2,5-DMP 重要底物^[3,6-7], 合成途径如图 1 所示。L-苏氨酸首先在苏氨酸脱氢酶的催化作用下生成 2-氨基-3-酮丁酸, 然后通过 3 步自发反应生成 2,5-DMP 等产物。其中, L-苏氨酸脱氢酶 (Threonine dehydrogenase, TDH, 编码基因 *tdh*) 是整个生化反应的关键限速酶, 因而筛选一种高活性的 TDH 对于 2,5-二甲基吡嗪的生物合成极为重要。TDH 是一类 NAD⁺ 依赖型且含 Zn²⁺ 的二元醇/多元醇脱氢酶, 是原核生物和真核生物中主要参与 L-苏氨酸分解代谢的酶^[8]。因此, 每合成 1 mol 2,5-DMP, 需消耗 2 mol NAD⁺, 同时产生 2 mol NADH。然而, 胞内 NADH/NAD⁺ 水平在微生物生长和产物发酵过程中发挥多种生理功能, 如调节胞内氧化还原水平、影响众多基因表达、细胞功能、代谢途径和物质跨膜运输等^[9]。因此, 胞内 NADH/NAD⁺ 供应与消耗的不平衡, 必将会影响 2,5-DMP 的合成。

在大肠杆菌中除了 TDH 参与 L-苏氨酸分解代谢外, 苏氨酸醛缩酶 (Threonine aldolase, TA, 编码基因 *tdcB*) 和苏氨酸脱氨酶 (Threonine deaminase, TD, 编码基因 *ilvA*) 也参与 L-苏氨酸

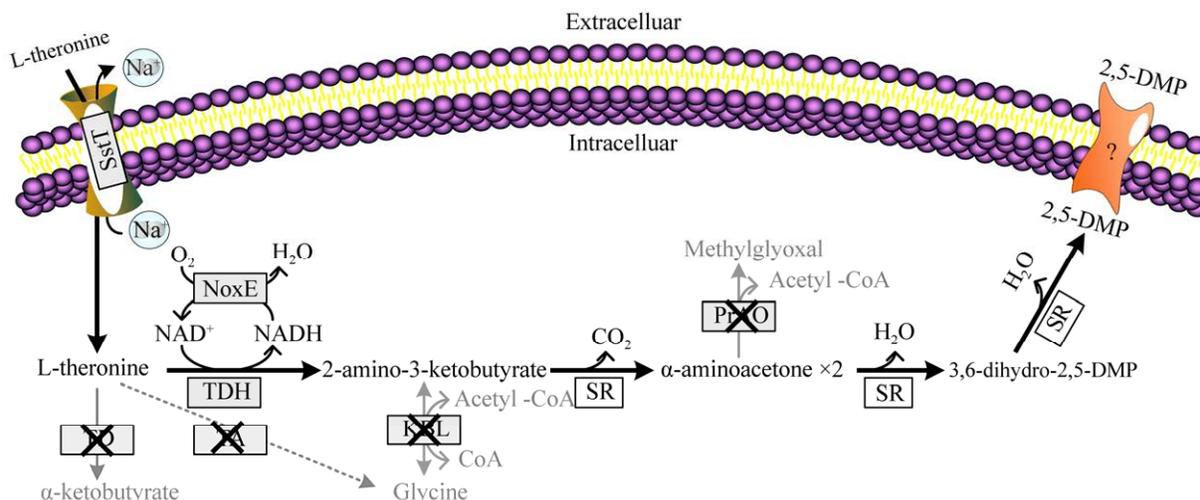


图1 以L-苏氨酸为底物合成2,5-DMP的生物途径

Fig. 1 The biosynthetic pathway of 2,5-DMP from L-threonine. "X" represents inactivation and "SR" represents spontaneous reaction.

分解代谢, 分别形成 β -羟基- α -苏氨酸和 α -酮基丁酸^[10-11]。因此, 在以L-苏氨酸为底物生物合成2,5-DMP时, TA和TD的存在必将影响L-苏氨酸合成2,5-DMP的转化效率。此外, 除了2,5-DMP合成的主代谢通路外还存在着其他代谢支路, 即: (1) 2-氨基-3-酮丁酸CoA连接酶(2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, KBL, 编码基因*kbl*)催化2-氨基-3-酮丁酸裂解形成甘氨酸^[12]; (2) 伯胺氧化酶(Primary amine oxidase, PrAO, 编码基因*tynA*)催化 α -氨基丙酮脱氨形成丙酮醛^[13](图1)。两条代谢支路的分流都会影响2,5-DMP的合成, 从而降低2,5-DMP产率和产量。

本研究旨在基于代谢工程理论改造大肠杆菌碳代谢途径, 降低副产物形成, 提高L-苏氨酸转化2,5-DMP的效率。在此基础上, 结合辅因子工程策略, 实现细胞内NAD(H⁺)平衡再生, 从而构建出以L-苏氨酸为底物高效清洁生产2,5-DMP的重组大肠杆菌底盘细胞。

1 材料与方法

1.1 试剂

KH₂PO₄、K₂HPO₄·3H₂O、NaOH和甘油购自

国药集团试剂有限公司。胰蛋白胨、酵母提取物购自英国Oxoid公司。2,5-DMP标准品(纯度99.8%)和 α -氨基丙酮标准品(纯度99.8%)购自美国ChromaDex公司。L-苏氨酸购自梅花生物科技集团股份有限公司。质粒提取试剂盒、Taq DNA聚合酶、DNA Marker和Protein Marker购自南京诺唯赞生物科技有限公司。各种限制性内切酶、甲醇(色谱纯)和甲酸(色谱纯)购自美国ThermoFisher Scientific公司。大肠杆菌表达质粒pRSFDuet-1由江南大学康振教授惠赠。

1.2 菌株与质粒

实验过程中涉及的菌株和质粒如表1所示。另外, 研究中使用的寡核苷酸列如表2所示。

1.3 培养基与转化体系

Luria-Bertani (LB) 培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L 和 NaCl 10 g/L, pH 7.0。Terrific-Broth (TB) 培养基: 胰蛋白胨 12 g/L、酵母提取物 24 g/L、甘油 4 mL/L、KH₂PO₄ 2.31 g/L 和 K₂HPO₄·3H₂O 16.42 g/L, 具体配制方法参照李阳等建立的方法进行^[14]。M9 基础培养基的配制参照Mundhada等建立的方法进行^[15]。

表 1 本研究所用到的主要菌种和质粒

Table 1 The main strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characters	References
Strains		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B m _B) λ(DE3)	Stratagene
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh_X</i>	<i>E. coli</i> BL21 harboring plasmid pRSFDuet- <i>tdh_X</i>	This study
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}-noxE_{Lc}</i>	<i>E. coli</i> BL21 harboring plasmid pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}-noxE_{Lc}</i>	This study
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}-PnoxE_{Lc}</i>	<i>E. coli</i> BL21 harboring plasmid pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}-PnoxE_{Lc}</i>	This study
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i>	<i>E. coli</i> BL21 harboring plasmid pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i>	This study
<i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i>	Deletion of genes <i>kbl</i> and <i>tynA</i> in strain BL21(DE3) chromosome	This study
<i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i> pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i>	<i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i> harboring plasmid pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i>	This study
<i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i> pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i> - <i>PsstT</i>	<i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i> harboring plasmid pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i> - <i>PsstT</i>	This study
<i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i> Δ <i>ltaE</i> Δ <i>ilvA</i>	Deletion of genes <i>ltaE</i> and <i>ilvA</i> in strain <i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i> chromosome	This study
<i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i> Δ <i>ltaE</i> Δ <i>ilvA</i> pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i> - <i>PsstT</i>	<i>E. coli</i> Δ <i>kbl</i> Δ <i>tynA</i> Δ <i>ltaE</i> Δ <i>ilvA</i> harboring plasmid pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i> - <i>PsstT</i>	This study
Plasmids		
pRSFDuet-1	Kan ^r , Expression vector with two multiple clone sites (MCSs), T7 promoter and <i>lac</i> operator	Stratagene
pRSFDuet- <i>tdh_X</i>	pRSFDuet-1 carrying gene <i>tdh</i> from different microorganisms	This study
pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}-noxE_{Lc}</i>	pRSFDuet-1 carrying gene <i>tdh</i> from <i>E. coli</i> and gene <i>noxE</i> from <i>L. cremoris</i> in the same MCS	This study
pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}-PnoxE_{Lc}</i>	pRSFDuet-1 carrying gene <i>tdh</i> from <i>E. coli</i> and gene <i>noxE</i> from <i>L. cremoris</i> in the different MCS	This study
pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i>	pRSFDuet-1 carrying the fusion gene <i>tdh_{Ec}-noxE_{Lc}</i>	This study
pRSFDuet- <i>tdh_{Ec}noxE_{Lc}</i> - <i>PsstT</i>	pRSFDuet-1 carrying the fusion genes <i>tdh_{Ec}-noxE_{Lc}</i> and <i>sstT</i> from <i>E. coli</i>	This study

转化体系(50 mL): 甘氨酸-NaOH 缓冲液(0.05 mol/L 甘氨酸+0.032 mol/L NaOH, pH 10.4), 5 g/L L-苏氨酸, 菌体 OD₆₀₀=5.0。

1.4 方法

1.4.1 苏氨酸脱氢酶基因 *tdh* 的克隆及重组菌的构建

基于 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库, 构建苏氨酸脱氢酶 (TDH) 系统进化树, 并从中挑选 20 种具有代表性微生物来源的 TDH (图 2A)。在 GenBank 数据库中分别获取 20 种来源的 TDH 氨基酸序列, 并提交给苏州金唯智生物科技有限公司根据大肠杆菌密码子偏好性进行优化、合成并连接至表达载体 pRSFDuet-1 的酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I 间, 获得重组质粒 pRSFDuet-*tdh_X* (*X* 表示不同微生物

来源)。将重组质粒 pRSFDuet-*tdh_X* 转化至感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 中, 通过卡那霉素 (Kan) 抗性筛选, 获得重组菌 *E. coli* BL21/pRSFDuet-*tdh_X*。

1.4.2 NADH 氧化酶基因 *noxE* 的克隆及重组菌的构建

在 GenBank 数据库中获取乳脂链球菌 *Lactococcus cremoris* MG1363 中 NADH 氧化酶 (NoxE) 基因序列 (登录号 AM406671.1), 并提交给苏州金唯智生物科技有限公司根据大肠杆菌密码子偏好性进行优化、合成并连接至表达载体 pRSFDuet-*tdh_X** (*tdh_X** 代表最佳微生物来源的 *tdh*, 编码 *X**TDH) 的酶切位点 *Eco*R I 和 *Hind* III 间, 获得重组质粒 pRSFDuet-*tdh_X*-noxE_{Lc}*, 或者连接至表达载体 pRSFDuet-*tdh_X** 的酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I 间, 获得重组质粒 pRSFDuet-*tdh_X*-PnoxE_{Lc}*。此外, 根据 *X**TDH 氨基酸序列和 NoxE 氨基酸序列设计融合

表 2 本研究所用到的引物序列

Table 2 Primer used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Cleavage sites	Purposes
<i>tdh</i> -F	CGGGATCCGATGAAAGCGTTATCCAAACT	<i>EcoR</i> I	Obtaining the gene of <i>tdh</i> from the genome of <i>E. coli</i> K-12
<i>tdh</i> -R	GGAATTCTTAATCCCAGCTCAGAATAACT	<i>Kpn</i> I	
<i>sstT</i> -F	GGAATTCATATGACTACGCAACGTTCCACC	<i>Nde</i> I	Obtaining the gene of <i>sstT</i> from the genome of <i>E. coli</i> K-12
<i>sstT</i> -R	CCGCTCGAGTTAATTACGCAGGGCGC	<i>Xho</i> I	
<i>kbl</i> -F	GCCAGTTGTTTACCAAT	-	Verifying the existence of <i>kbl</i>
<i>kbl</i> -R	TGCGTGGAGAATTTTATC	-	
Δ <i>kbl</i> -F	CAGATGCCCTCTTCCGCTTTCAGTTTGGATAACGCTT TCATCTCACATCCCCTTGTAGCGATTGTGTAG	-	Obtaining the knockout target fragment of <i>kbl</i> gene from pKD13
Δ <i>kbl</i> -R	TATAAGTTTGGGTAATATGTGCTGGAATTTGCCCTGT CTGGAGAATCGCAGATAAGCTGTCAAACATGAG	-	
Δ <i>kbl</i> -YF	CGGAATAGGAACTTCAAG	-	Verifying the elimination of kanamycin markers
Δ <i>kbl</i> -YR	CCGGATGAATGTCAGCTA	-	
<i>tynA</i> -F	TTCTTCAGCGCCCTAGC	-	Verifying the existence of <i>tynA</i>
<i>tynA</i> -R	ATGCTCGACGGCAAACAT	-	
Δ <i>tynA</i> -F	GCTCATAAGTAAAAACGGCGCCTGGTGCCGTTTTTT TAGTCTGAAACAACGTCTTGTAGCGATTGTGTAG	-	Obtaining the knockout target fragment of <i>tynA</i> gene from pKD13.
Δ <i>tynA</i> -R	TTGCGTGGAAAAACAACCGGTGACCAGCCGCGCA AAGCCGACGTCATTGATAAGCTGTCAAACATGAG	-	
Δ <i>tynA</i> -YF	ACGGCGCCTGGTGCCGT	-	Verifying the elimination of kanamycin markers.
Δ <i>tynA</i> -YR	CGTTGACCAGCCGCGCA	-	
<i>ltaE</i> -F	TCAACGAAACCGGTGAT	-	Verifying the existence of <i>ltaE</i>
<i>ltaE</i> -R	GATCTGCCGGTTGCTAT	-	
Δ <i>ltaE</i> -F	CTGGATACAATGCTATCTGAAGTACTCATATCCTATC CTCAACGAATTAACGTCTTGTAGCGATTGTGTAG	-	Obtaining the knockout target fragment of <i>ltaE</i> gene from pKD13
Δ <i>ltaE</i> -R	GTGTCCGGTTACGGTTACCTACATATTTAATTCAGGCG AAGAGGTTTTATAGATAAGCTGTCAAACATGAG	-	
Δ <i>ltaE</i> -YF	CGGAATAGGAACTTCAAG	-	Verifying the elimination of kanamycin markers
Δ <i>ltaE</i> -YR	CCGGATGAATGTCAGCTA	-	
<i>ilvA</i> -F	ATGGCTGACTCGCAAC	-	Verifying the existence of <i>ilvA</i>
<i>ilvA</i> -R	CTAACCCGCCAAAAAGAAC	-	
Δ <i>ilvA</i> -F	AGCGCCGACAAAGGTGCGGTGCGCGATAAATCGAAA CTGGGGGGTTAATGCGTCTTGTAGCGATTGTGTAG	-	Obtaining the knockout target fragment of <i>ilvA</i> gene from pKD13
Δ <i>ilvA</i> -R	GTTGTCCGCGGGTAGGCCTGATAAGCGAAGCGCTA TCAGGCATTTTTCCGATAAGCTGTCAAACATGAG	-	
Δ <i>ilvA</i> -YF	GTGCGGTGCGCGATAAAT	-	Verifying the elimination of kanamycin markers
Δ <i>ilvA</i> -YR	GCGCGGGTAGGCCTGAT	-	

Note: the letters with underline represent cleavage sites and the bold letters represent the homologous sequence of the target genes.

蛋白, 在两者之间加入 (GGGS) \times 2 作为融合蛋白 Linker, 将拼接融合蛋白氨基酸序列提交给苏州金唯智生物科技有限公司根据大肠杆菌密码子偏好性进行优化、合成并连接至表达载体 pRSFDuet-1 的酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind* III 间, 获得重组质粒 pRSFDuet-*tdh*_{X*}-*noxE*_{Lc}。分别将重

组质粒 pRSFDuet-*tdh*_{X*}-*noxE*_{Lc}、pRSFDuet-*tdh*_{X*}-*PnoxE*_{Lc} 和 pRSFDuet-*tdh*_{X*}-*noxE*_{Lc} 转化至感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 中, 通过 Kan 抗性筛选, 获得重组菌 *E. coli* pRSFDuet-*tdh*_{X*}-*noxE*_{Lc}、*E. coli* pRSFDuet-*tdh*_{X*}-*PnoxE*_{Lc} 和 *E. coli* pRSFDuet-*tdh*_{X*}-*noxE*_{Lc}。

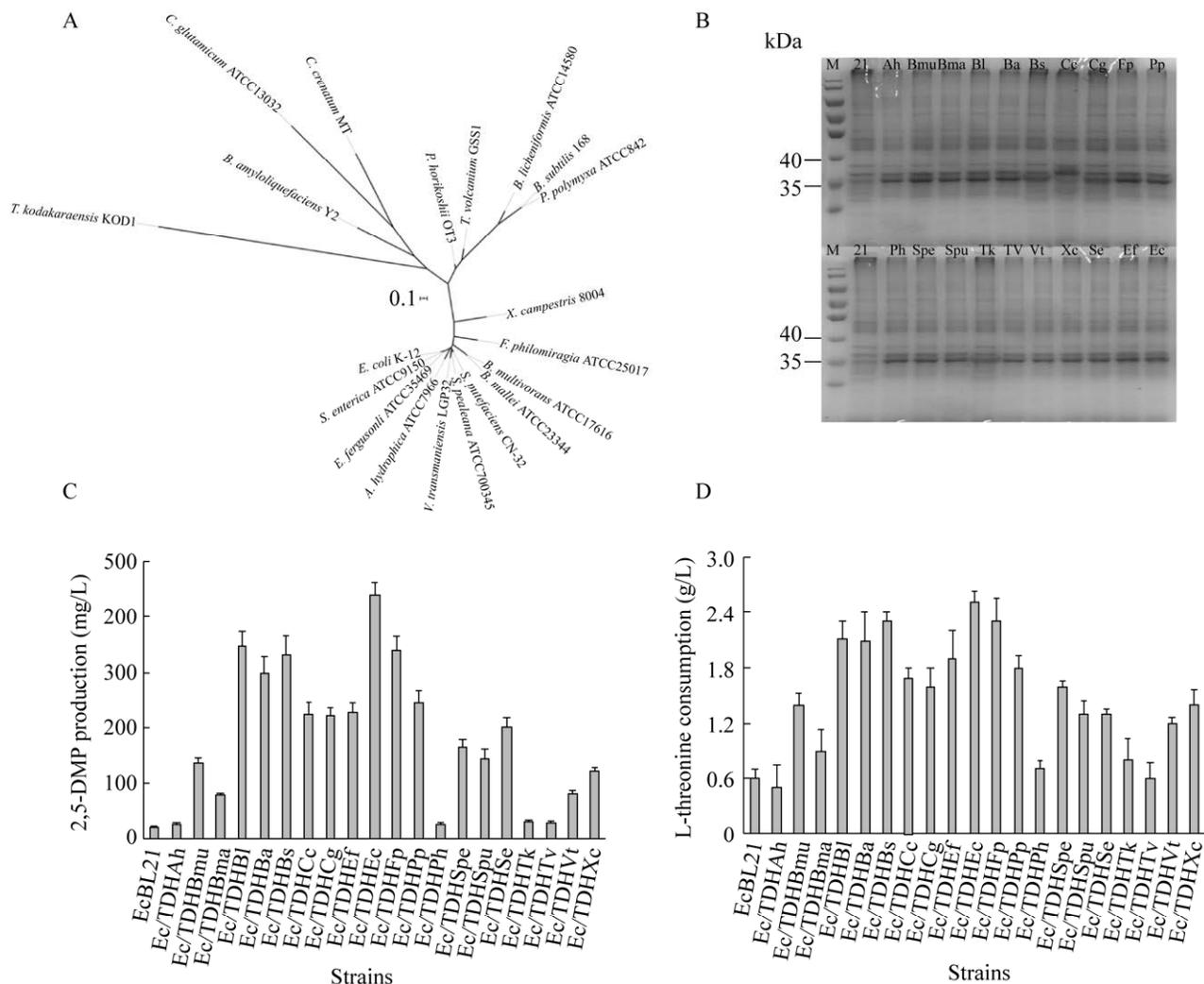


图2 不同来源 TDH 的多样性 (A) 和 SDS-PAGE (B) 分析以及对 2,5-DMP 合成 (C) 和 L-苏氨酸消耗 (D) 的影响

Fig. 2 Diversity analysis (A) and SDS-PAGE analysis (B) of TDH as well as the 2,5-DMP accumulation (C) and L-threonine consumption (D) in strains with overexpression of different TDH.

1.4.3 苏氨酸转运蛋白 SstT 基因 *sstT* 的克隆及重组菌的构建

根据 GenBank 数据库中的 *sstT* 基因序列 (登录号 AP009048.1), 设计 PCR 扩增引物, 上下游引物分别引入酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I, 并进行 PCR 扩增。将纯化后的 PCR 产物即 *sstT* 片段与重组载体 pRSFDuet-*tdh_X*noxE* 分别用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 回收目的片段后以 T4 DNA 连接酶于 16 °C 条件下连接 12 h。将酶连

产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 并涂布于含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 平板并于 37 °C 培养 12 h。挑取单菌落并提取质粒, 经 *Nde* I/*Xho* I 双酶切验证得到阳性克隆, 并送样进行 DNA 测序, 获得目标重组质粒 pRSFDuet-*tdh_X*noxE-PsstT*。

1.4.4 基因 *kbl*、*tynA*、*ltaE* 和 *ilvA* 的敲除

E. coli BL21(DE3) 中基因的敲除参照 Datsenko 和 Wanner 建立的方法进行^[16]。具体方法如下: 首先, 使用 pKD13 作为 PCR 模板, 将引物 Δ A-F

和 ΔA -R (A 代表需要敲除的目标基因) 扩增获得含有基因 A 的上游和下游同源臂序列、卡那霉素抗性基因 *kan* 和 2 个 FRT 位点的 DNA 片段, 随后电转入 *E. coli*/pKD46 感受态细胞中并于 37 °C 孵育 2 h 后涂布在含有 25 μ g/mL Kan 的 LB 平板 (LBK₂₅) 上。培养 12 h 后挑取单个菌落, 使用引物 A-F 和 A-R 进行菌落 PCR 扩增, 挑选基因 A 敲除成功的菌落。最后, 为了消除 *kan* 基因, 将携带 FLP 重组酶的温敏型质粒 pCP20, 电转入 *E. coli* BL21 $\Delta A::kan$ 菌株中, 42 °C 培养 12 h 后稀释并涂布在 LB 固体培养基上。挑取单个菌落, 分别点种在 LBK₂₅ 平板和 LB 平板, 37 °C 培养 12 h, 挑取仅能在 LB 平板上生长的单菌落用引物 ΔA -YF 和 ΔA -YR 进行菌落 PCR 验证, 片段大小正确即为目标菌株 *E. coli* BL21 ΔA 。

1.4.5 酶活性的测定

菌株含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中于 37 °C、100 r/min 条件下诱导培养 16 h。随后, 4 °C、8 000 r/min 离心收集菌体。收集的菌体用 0.85% 生理盐水洗涤 2 次。TDH 测定时, 将菌体悬浮于含 150 mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L, pH 8.0) 中并超声波破碎制备粗酶液并用于 TDH 的测定, 具体测定方法参照 Zhang 等建立的方法进行^[3]。NoxE 测定时, 将菌体悬浮于含有 2 mmol/L MgCl₂ 和 1 mmol/L 二硫苏糖醇的磷酸盐缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.5) 并超声波破碎制备粗酶液并用于 NoxE 的测定, 具体测定方法参照 Kim 等建立的方法进行^[17]。

1.4.6 细胞培养与全细胞转化

LB 培养基和 TB 培养基都用于培养大肠杆菌, 其中前者培养的菌体基因操作, 培养时间 10–12 h; 后者培养的菌体用于细胞转化, 培养时间 24 h。非特殊说明, 培养温度为 37 °C、转速为 100 r/min、接种量为 1% (V/V)。在合适的情况下, 添加终浓度为 50 μ g/mL 的 Kan 或/和终浓度为 0.5 mmol/L 的诱导剂异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)。

全细胞转化时, 菌体培养 24 h 后经 5 000 r/min、

4 °C 离心 7 min 收集菌体, 并用生理盐水洗涤 2 次, 最后用 15 mL 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 10.4) 重悬菌体。非特殊说明, 转化温度为 37 °C、转速为 200 r/min。

1.4.7 高效液相法定性定量分析

采用 Waters 超高效液相色谱仪 (UPLC) 对 2,5-DMP 进行定量检测, 具体方法参照 Zhang 等建立的方法进行^[3]。其中流动相 A 为 0.1% (W/V) 甲酸溶液, 流动相 B 为 0.1% (W/V) 甲醇溶液, 流速 0.2 mL/min, 检测波长为 275 nm。取 2,5-DMP 标准品配制成不同浓度梯度, 绘制标准曲线并计算回归方程, 将测得的样品数值代入回归方程, 确定 2,5-DMP 浓度。

2 结果与分析

2.1 筛选最佳苏氨酸脱氢酶 (TDH), 促进 L-苏氨酸有效转化 2,5-DMP

根据 NCBI 中蛋白质数据库中关于 TDH 记录可知 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=Threonine+dehydrogenase>), 截至目前不少于 210 000 种 TDH 被报道。然而, 前人研究发现不同微生物来源的 TDH 具有不同的底物亲和性和最适作用温度^[3,8,18]。为了获得能在大肠杆菌中有效催化 2,5-DMP 合成的最佳 TDH, 本研究基于蛋白质系统进化树选择了 20 种具有代表性微生物来源的 TDH 进行克隆表达 (图 2A), 并考察其对 2,5-DMP 产量的影响。

研究结果表明, 所选择的 20 种不同微生物来源的 TDH 经密码子优化后都可以在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达, 蛋白质分子大小约为 37 kDa (图 2B)。酶活性分析发现, 不同来源的 TDH 都表现出 TDH 酶活性, 但是来源于嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophica* ATCC7966、超好热始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 和 *Thermoplasma volcanium* GSS1 的 TDH 酶活性很低 (≤ 6.0 mU/mg 蛋白, 表 3)。在这 20 种不同来源的 TDH 中, 来源于 *E. coli* MG1655 中的 *EcTDH* 表现出最高酶活

表 3 出发菌株和重组菌株 TDH 和 NoxE 酶活力测定
Table 3 The specific activity of TDH and NoxE in original strain and recombinant strains

Strains	TDH (mU/mg protein)		NoxE (mU/mg protein)
	NAD ⁺	NADH	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	3.1±0.2	<1	18.6±2.5
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Ah}	4.5±1.3	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Bmu}	38.9±3.6	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Bma}	22.5±2.5	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Bl}	99.1±7.3	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Ba}	85.3±6.9	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Bs}	94.8±10.2	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Cc}	64.1±3.5	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Cg}	63.4±4.7	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Fp}	97.0±5.4	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Pp}	70.1±5.9	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Ph}	4.8±1.9	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Spe}	47.5±4.6	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Spu}	41.4±4.3	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Tk}	6.0±1.6	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Tv}	5.2±1.1	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Vt}	23.2±1.7	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Xc}	34.6±4.3	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Se}	57.9±6.6	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Ef}	65.2±5.5	<1	-
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Ec}	124.5±7.4	<1	19.5±1.8
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Ec} - <i>noxELc</i>	125.2±16.6	108.4±9.1	278.3±26.6
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Ec} - <i>PnoxELc</i>	134.1±12.2	127.5±13.4	334.5±34.1
<i>E. coli</i> pRSFDuet- <i>tdh</i> _{Ec} <i>noxELc</i>	125.4±11.7	125.0±12.3	295.3±23.4

Ah: *A. hydrophica* ATCC7966; Cc: *C. crenatum* MT; Cg: *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032; Bmu: *Burkholderia multivorans* ATCC17616; Bma: *B. mallei* ATCC23344; Bl: *Bacillus licheniformis* ATCC14580; Ba: *B. amyloliquefaciens* Y2; Bs: *B. subtilis* 168; Fp: *Francisella philomiragia* ATCC25017; Pp: *Paenibacillus polymyxa* ATCC842; Ph: *Pyrococcus horikoshii* OT3; Spe: *Shewanella pealeana* ATCC700345; Spu: *S. putefaciens* CN-32; Se: *Salmonella enterica* ATCC9150; Tk: *T. kodakaraensis* KOD1; Tv: *T. volcanium* GSS1; Vt: *Vibrio transmaniensis* LGP32; Xc: *Xanthomonas campestris* 8004; Ef: *Escherichia fergusonii* ATCC35469; “-”: no detection.

力, 比酶活力达到 (124.5±7.4) mU/(mg 蛋白)。此外, 不同微生物来源的 TDH 表达菌株积累 2,5-DMP 能力也具有显著性差异。在含有 5 g/L L-苏氨酸转化体系中全细胞转化 24 h, 来源于 *E. coli* MG1655 中的 *Ec*TDH 表达菌株 *E. coli* pRSFDuet-*tdh*_{Ec} (即 *Ec*/TDH_{Ec}) 积累 2,5-DMP 浓度最高 (438.3±23.7 mg/L), 且消耗 L-苏氨酸量最高 (图 2C-D)。然而, 来源于 *A. hydrophica* ATCC7966、*T. kodakaraensis* KOD1 和 *T. volcanium* GSS1 的 TDH 表达菌株中 2,5-DMP 积累量和 L-苏氨酸消耗量与出发菌株无明显变化 (图 2C-D)。综合上述结果, 在 *E. coli* 过表达来源于 *E. coli* MG1655 中的 *Ec*TDH 可以实现有效催化 L-苏氨酸合成 2,5-DMP。

2.2 优化 NADH 氧化酶 (NoxE) 酶活水平, 提高胞内 NAD⁺再生能力

*Ec*TDH 是以 NAD⁺为辅因子催化 L-苏氨酸氧化脱氢生成 2-氨基-3-酮丁酸。因此, 每合成 1 mol 2,5-DMP, 需消耗 2 mol NAD⁺, 同时产生 2 mol NADH。NADH 氧化酶 (NoxE) 催化 NADH 氧化成 NAD⁺, 同时将 O₂ 还原成 H₂O^[19]。为了满足 2,5-DMP 合成过程中对 NAD⁺的需要以及平衡胞内 NADH/NAD⁺水平, 本研究异源表达了来源于 *L. cremoris* MG1363 中 NoxE, 并考察了 *Lc*NoxE 不同表达方式对 2,5-DMP 合成的影响。pRSFDuet-1 具有两个多克隆位点 (MCS), 且每一个多克隆位点由 T7 启动子、lac 操纵子和一个核糖体结合位点 (RBS) 组成。根据质粒 pRSFDuet-1 的特点, 本实验通过将密码子优化后的目标基因 *noxELc* 插入到不同 MCS 位点处或者将 *Ec*TDH 与 *Lc*NoxE 组成融合蛋白, 从而获得不同 *Lc*NoxE 表达方式重组质粒 pRSFDuet-*tdh*_{Ec}-*noxELc*、pRSFDuet-*tdh*_{Ec}-*PnoxELc* 和 pRSFDuet-*tdh*_{Ec}*noxELc* (图 3A)。随后, 分别将重组质粒 pRSFDuet-*tdh*_{Ec}-*noxELc*、pRSFDuet-*tdh*_{Ec}-*PnoxELc* 和 pRSFDuet-*tdh*_{Ec}*noxELc* 转化至宿主细胞 *E. coli* BL21(DE3) (即 *Ec*BL21)

中, 获得重组菌 *E. coli* pRSFDuet-*tdh*_{Ec}-*noxE*_{Lc} (即 *Ec*/*TDH*_{Ec}-*NoxE*_{Lc})、*E. coli* pRSFDuet-*tdh*_{Ec}-*PnoxE*_{Lc} (即 *Ec*/*TDH*_{Ec}-*PNoxE*_{Lc}) 和 *E. coli* pRSFDuet-*tdh*_{Ec}*noxE*_{Lc} (即 *Ec*/*TDH*_{Ec}*NoxE*_{Lc})。与菌株 *Ec*/*TDH*_{Ec} 比较, 上述 3 株重组菌在 LB 和 TB 液体培养基的生长受到一定的抑制, 其中菌株 *Ec*/*TDH*_{Ec}-*PNoxE*_{Lc} 生物量降低明显 (图 3B)。对不同重组菌株蛋白表达情况进行 SDS-PAGE 分析表明, 在 37 kDa、50 kDa

和 90 kDa 附近有明显加粗的蛋白条带, 说明菌株中 *Ec*TDH 和 *Lc*NoxE 均表达 (图 3C)。

此外, 上述 3 株重组菌株均能检测到 *Ec*TDH 和 *Lc*NoxE 酶活力, 其中重组菌 *Ec*/*TDH*_{Ec}-*PNoxE*_{Lc} 表现出最高的 *Ec*TDH 和 *Lc*NoxE 酶活力, 而重组菌 *Ec*/*TDH*_{Ec}-*NoxE*_{Lc} 酶活力最低 (表 3)。需要指出的是, 将 TDH 酶活测定体系中的 NAD⁺换成 NADH 时, 依然能检测到上述 3 株重组菌中 TDH

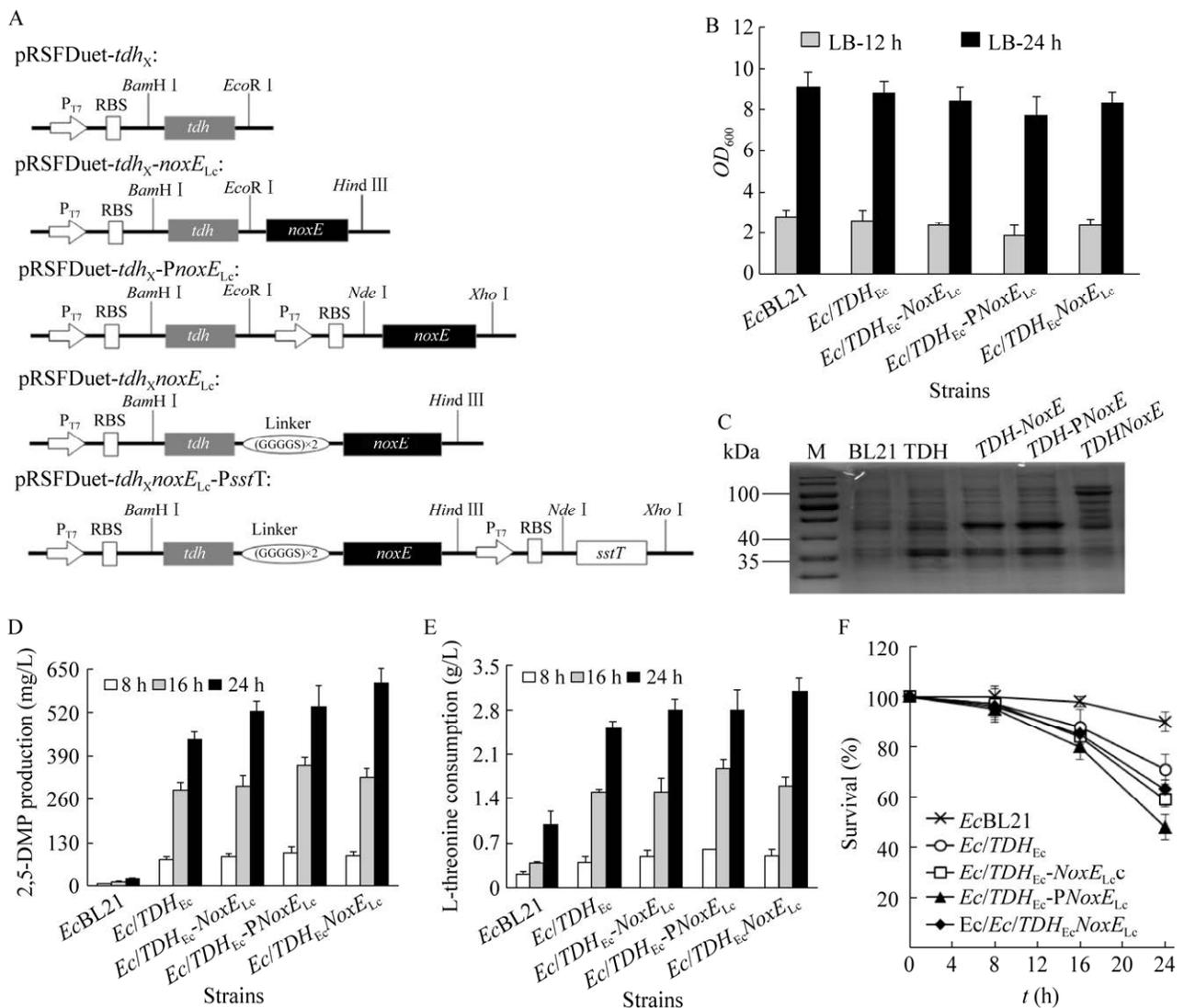


图 3 不同 NoxE 表达方式重组质粒的构建 (A) 及其对菌体生长 (B)、表达水平 (C)、2,5-DMP 积累 (D)、L-苏氨酸消耗 (E) 和菌体存活率 (F) 的影响

Fig. 3 Construction of plasmids with overexpression of NoxE in different expression mode (A) and its effects on cell growth (B), expression level (C), 2,5-DMP accumulation (D), L-threonine consumption (E) as well as cell survival (F).

酶活性,而出发菌 *EcBL21* 和重组菌 *Ec/TDH_{Ec}* 未能检测到(表 3)。这些结果表明,异源表达 *LcNoxE* 可以有效催化 NADH 转化形成 NAD⁺, 从而满足 TDH 对辅因子的需求。随后,对上述 3 株重组菌进行全细胞催化合成 2,5-DMP 实验,每 8 h 测定转化体系中 L-苏氨酸残留量和 2,5-DMP 生成量,结果如图 3D 所示。从图中可以看出,菌株 *Ec/TDH_{Ec}-NoxE_{Lc}*、*Ec/TDH_{Ec}-PNoxE_{Lc}* 和 *Ec/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 中 2,5-DMP 的积累量明显高于菌株 *Ec/TDH_{Ec}*,表明 *LcNoxE* 促进 *EcTDH* 催化 L-苏氨酸合成 2,5-DMP。菌株 *Ec/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 利用 5 g/L L-苏氨酸转化 24 h,最终 2,5-DMP 产量可达 (605.1±56.4 mg/L),与菌株 *Ec/TDH_{Ec}* 相比产量增加了 38.1% (图 3D)。此外,菌株 *Ec/TDH_{Ec}-NoxE_{Lc}*、*Ec/TDH_{Ec}-PNoxE_{Lc}* 和 *Ec/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 对 L-苏氨酸消耗量也要高于菌株 *Ec/TDH_{Ec}*,其中菌株 *Ec/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 消耗量最高,达到 (3.1±0.2) g/L (图 3E)。

2.3 阻断 2,5-DMP 合成途径代谢支路,降低副产物积累量

从 2,5-DMP 合成途径可知(图 1),每 mol L-苏氨酸可以合成 0.5 mol 2,5-DMP,理论产物得率为 0.454 g/(g L-苏氨酸)。然而,从图 3D 和图 3E 可知,利用菌株 *Ec/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 全细胞催化合成 2,5-DMP 时,L-苏氨酸的产物得率仅为 0.195 g/(g L-苏氨酸),远低于理论产物得率水平。对转化后体系中副产物分析发现,体系除了积累了目标产物 2,5-DMP 外,还积累了一定量的甘氨酸(图 4A)。从图 1 可知,2,5-DMP 前体物 2-氨基-3-酮丁酸和 α -氨基丙酮分别在 KBL 和 PrAO 催化作用下,分别裂解形成甘氨酸和脱氨形成丙酮醛。为了降低副产物的积累量,本实验采用 Red 重组技术同时敲除了 *EcBL21* 中 KBL 和 PrAO 编码基因 *kbl* 和 *tynA*,获得重组菌 *E. coli $\Delta kbl \Delta tynA$* (即 *Ec $\Delta k\Delta A$*)。与菌株 *EcBL21* 相比,菌株 *Ec $\Delta k\Delta A$* 生长状况无明显变化(图 4B),但是 2,5-DMP 积累量有一定的提高,且甘氨酸积累量显著降低(图 4A 和 4C)。

随后,将重组质粒 pRSFDuet-*tdh_{Ec}noxE_{Lc}* 电转到 *Ec $\Delta k\Delta A$* ,获得重组菌 *Ec $\Delta k\Delta A$ pRSFDuet-*tdh_{Ec}noxE_{Lc}** (即 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}*)。重组菌 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 2,5-DMP 积累量从 (605.1±56.4) mg/L 提高至 (908.4±93.9) mg/L, L-苏氨酸的产物得率从 0.195 g/g L-苏氨酸提高到 0.275 g/g L-苏氨酸,比菌株 *Ec/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 分别提高了 50.1% 和 41.0%。虽然重组菌 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 2,5-DMP 积累量和 L-苏氨酸的产物得率都有显著提高,但是其 L-苏氨酸消耗量仅为 (3.3±0.4) g/L (图 4D)。

2.4 强化 L-苏氨酸转运能力,增加 L-苏氨酸消耗速率

如前所述,*Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* L-苏氨酸消耗量仅为 (3.3±0.4) g/L,这或许是限制 2,5-DMP 产量的一个因素。为此,本研究过表达了参与 L-苏氨酸转运的转运蛋白 SstT,并考察了重组菌 *E. coli $\Delta kbl \Delta tynA$ pRSFDuet-*tdh_{Ec}noxE_{Lc}*-P*sstT** (即 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-P*sstT**) L-苏氨酸消耗量和 2,5-DMP 产量的变化。从图 4D 可知,重组菌 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-P*sstT** L-苏氨酸消耗量从 (3.3±0.4) g/L 提高至 (4.3±0.3) g/L,比菌株 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 提高了 30.3%。然而,重组菌 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-P*sstT** 2,5-DMP 积累量并没有显著提高,比菌株 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 仅提高了 6.9% ((971.3±46.5) mg/L vs (908.4±93.9) mg/L,图 4C)。此外,重组菌 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-P*sstT** 还积累了 (41.0±3.0) mg/L 的甘氨酸(图 4A)。

2.5 减少 L-苏氨酸分解代谢途径,提高 L-苏氨酸转化效率

在大肠杆菌中除了 TDH 参与 L-苏氨酸分解代谢外,TA 和 TD 也参与 L-苏氨酸分解代谢,最终形成甘氨酸和 L-异亮氨酸。为了提高 L-苏氨酸的转化效率,本研究通过敲除菌株 *Ec $\Delta k\Delta A$ /TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-P*sstT** 中 TA 和 TD,减少 L-苏氨酸其他分解代谢途径,使得菌株只能通过 TDH 分解 L-苏氨酸形成 2-氨基-3-酮丁酸参与 2,5-DMP 的合

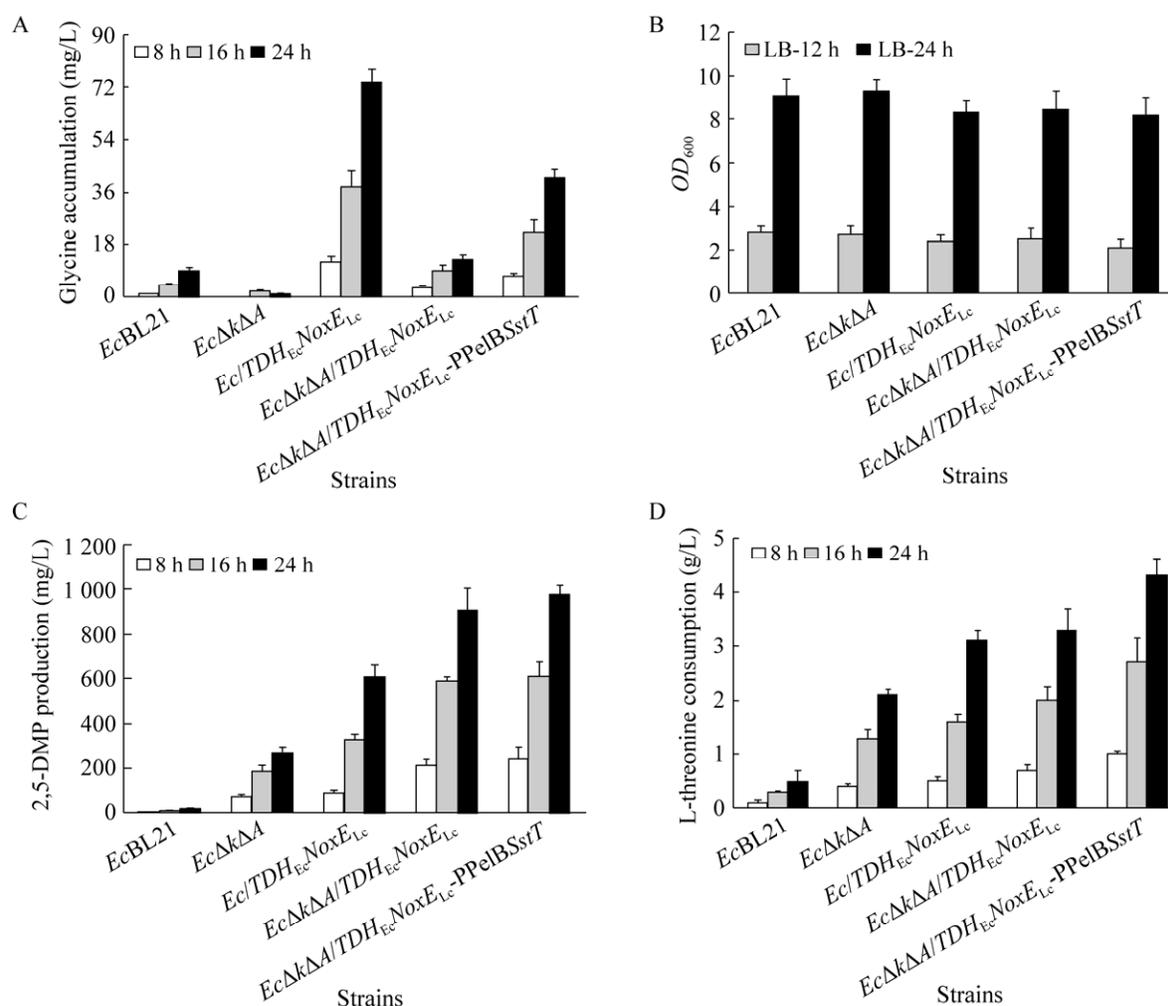


图 4 失活 KBL 和 PrAO 以及过表达 SstT 对副产物积累 (A)、菌体生长 (B)、2,5-DMP 积累 (C) 和 L-苏氨酸消耗 (D) 的影响

Fig. 4 The effects of inactivation of KBL and PrAO as well as overexpression of SstT on by-products accumulation (A), cell growth (B), 2,5-DMP accumulation (C) and L-threonine consumption (D).

成。失活 TD，菌体生长受到一定影响，尤其在 M9 基础培养基上培养时，TD 失活菌株不能生长，除非添加 0.5 g/L L-异亮氨酸。重组菌 *E. coli Δkbl ΔtynA ΔtaE ΔilvA pRSFDuet-tdh_{Ec}nox_{E_{Lc}}-PsstT* (即 *EcΔkΔAΔBΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-PSstT*) 中 2,5-DMP 积累量达到 (1 095.7±81.3) mg/L，比菌株 *EcΔkΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-PSstT* 和 *EcΔkΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 分别提高了 12.8% 和 20.6% (图 5A)。虽然重组菌 *EcΔkΔAΔBΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-PSstT* 中 L-苏氨酸消耗量低于菌株 *EcΔkΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-PSstT* (图 5B)，

但是其 2,5-DMP 产物得率达到 0.288 g/(g L-苏氨酸)。

3 讨论

作为烷基吡嗪类化合物中的重要一员，2,5-DMP 在食品香料与医药方面具有重要的经济价值^[2-3]。目前，工业上普遍采用化学合成法生产 2,5-DMP^[4]。相对于化学合成法，微生物合成法具有反应条件温和和环境友好的特点，且产品是天然的，因此更受消费者喜爱。然而，由于微生物合成法合成 2,5-DMP 的产量很低，常被研究者忽视，所

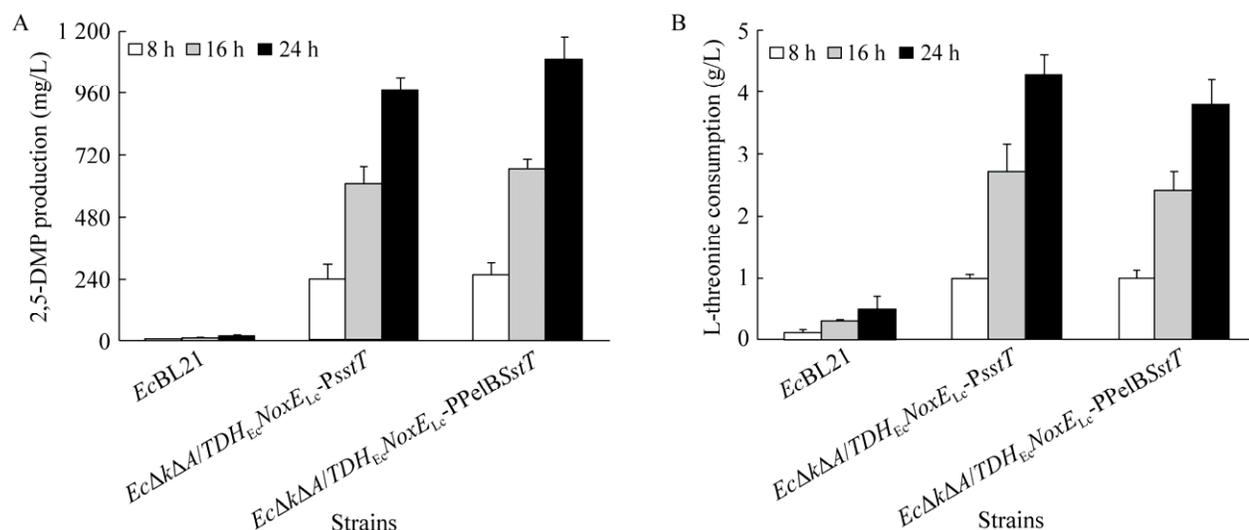


图5 失活 TA 和 TD 对 2,5-DMP 积累 (A) 和 L-苏氨酸消耗 (B) 的影响

Fig. 5 The effects of inactivation of TA and TD on 2,5-DMP accumulation (A) and L-threonine consumption (B).

以目前关于这方面的报道还很少^[4,6,20]。本研究首次结合代谢工程和辅因子工程策略设计了可高效催化 L-苏氨酸合成 2,5-DMP 的全细胞催化剂 *EcΔkΔAΔBΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-PSstT*。该菌株在含有 5 g/L L-苏氨酸的转化体系中于 37 °C、200 r/min 孵化 24 h,可积累 (1 095.7±81.3) mg/L 的 2,5-DMP, 2,5-DMP 产物得率达到 0.288 g/(g L-苏氨酸)。

以 L-苏氨酸为底物合成 2,5-DMP 时, TDH 是第一个关键酶,也是第一个限速酶。本研究在考察 20 种具有代表性微生物来源的 TDH 时发现,尽管在 *E. coli* 中不同来源的 TDH 都可以表达,但是不同来源的 TDH 都表现出 TDH 酶活力大小不一 (表 3)。这一结果与曹艳丽等报道的不同,她们发现有些微生物来源的 TDH 不能在 *B. subtilis* 中正常表达,原因是因为供体菌株与宿主菌株亲缘关系相距较远^[20]。然而,不同微生物来源的 TDH 具有不同的底物亲和性和最适作用温度^[3,8,18],这也许是在现有的 TDH 酶活性测定条件下酶活力大小不一的原因。与酶活力结果一致,不同微生物来源的 TDH 表达菌株积累 2,5-DMP 能力也具有显著性差异,其中来源于 *E. coli* MG1655 中的 *EcTDH* 表达菌株 *Ec/TDH_{Ec}* 积累 2,5-DMP 浓度最

高 ((438.3±23.7) mg/L),且消耗 L-苏氨酸量最高 (图 2C-D)。这一结果与曹艳丽等报道的一致,他们发现过表达 *EcTDH* 的重组菌 *B. subtilis* 168/pMA0911-*tdh* (*E. coli*) 在含有 5.83 g/L L-苏氨酸的 LB 液体培养基中发酵 24 h 可积累 527.43 mg/L 的 2,5-DMP^[20]。这些结果表明,来源于 *E. coli* MG1655 中的 *EcTDH* 可以实现有效催化 L-苏氨酸合成 2,5-DMP。

来源于 *E. coli* 中的 *EcTDH* 是以 NAD⁺ 为辅因子参与 L-苏氨酸还原反应。研究发现,重组菌 *Ec/TDH_{Ec}* 在转化后期 2,5-DMP 合成能力明显不足 (图 3D),其原因可能是辅因子 NAD⁺ 不足,从而影响 *EcTDH* 酶活力。此外,对不同转化时间后菌体存活率分析发现,重组菌 *Ec/TDH_{Ec}* 在转化后期细胞大量裂解死亡,而重组菌 *Ec/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 却保持较高的存活率 (图 3F)。有研究指出,胞内 NADH/NAD⁺ 水平在微生物生长中发挥多种生理功能,影响细胞功能^[21]。由于重组菌 *Ec/TDH_{Ec}* 持续消耗胞内 NAD⁺ 而积累 NADH,从而造成胞内 NADH/NAD⁺ 不平衡,从而影响细胞功能。相反,表达来源于 *L. cremoris* MG1363 中 *LcNoxE*,可以催化 NADH 合成 NAD⁺,从而平衡胞内

NADH/NAD⁺水平。除了具有较高的细胞存活率外,重组菌 *Ec/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}* 也表现出高的 2,5-DMP 积累量,产量达到 (605.1±56.4) mg/L。相似结果也发现在利用酿酒酵母构建高产 2,3-丁二醇重组菌株的研究中^[17]。

尽管通过耦合表达 *EcTDH* 和 *LcNoxE* 可以显著提高 2,5-DMP 产量,但是 2,5-DMP 产物得率仍然远低于理论产物得率水平 [0.195 g/(g L-苏氨酸) vs 0.454 g/(g L-苏氨酸)]^[4]。以 L-苏氨酸为底物合成 2,5-DMP 代谢途径中存在许多代谢支路(图 1),如 KBL 参与催化的甘氨酸合成途径、PrAO 参与催化的丙酮醛合成途径以及 L-苏氨酸其他两个分解代谢途径。这些支路途径的存在都可能影响 2,5-DMP 产量,降低 L-苏氨酸转化率。研究发现,通过阻断上述支路代谢途径,可以显著减少副产物积累,增加 2,5-DMP 产量,同时提高 L-苏氨酸转化率(图 4-5)。本研究最终获得的重组菌 *EcΔkΔAΔBΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-PSstT* 中 2,5-DMP 产物得率达到 0.288 g/(g L-苏氨酸),2,5-DMP 收率达到了 48.2%,高于曹艳丽等报道的产物得率 0.232 g/(g L-苏氨酸) 和 23.3% 的 2,5-DMP 收率^[20] 以及 Larroche 等报道的 2.5% 的 2,5-DMP 收率^[6]。因此,利用重组菌 *EcΔkΔAΔBΔA/TDH_{Ec}NoxE_{Lc}-PSstT* 直接全细胞转化 L-苏氨酸合成 2,5-DMP 具有很大优势。

REFERENCES

- [1] Guo XY, Song CK, Ho CT, et al. Contribution of L-theanine to the formation of 2,5-dimethylpyrazine, a key roasted peanutty flavor in Oolong tea during manufacturing processes. *Food Chem*, 2018, 263: 18-28.
- [2] 韩雪梅. 2,5-二甲基吡嗪的合成新方法及 5-甲基吡嗪-2-羧酸的合成探索[D]. 济南: 山东大学, 2005. Han XM. The new method for synthesizing 2,5-dimethylpyrazine and investigation of the method for synthesizing 5-methylpyrazine-2-carboxylic acid[D]. Ji'nan: Shandong University, 2005 (in Chinese).
- [3] Zhang LJ, Cao YL, Tong JA, et al. An alkylpyrazine synthesis mechanism involving L-threonine-3-dehydrogenase describes the production of 2,5-dimethylpyrazine and 2,3,5-trimethylpyrazine by *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(24): e01807-19.
- [4] Besson I, Creuly C, Gros JB, et al. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47(5): 489-495.
- [5] Xiao ZJ, Hou XY, Lyu X, et al. Accelerated green process of tetramethylpyrazine production from glucose and diammonium phosphate. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 106.
- [6] Larroche C, Besson I, Gros JB. High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochem*, 1999, 34(6/7): 667-674.
- [7] Silva-Junior EA, Ruzzini AC, Paludo CR, et al. Pyrazines from bacteria and ants: convergent chemistry within an ecological niche. *Sci Rep*, 2018, 8: 2595.
- [8] Desjardins M, Mak WS, O'Brien TE, et al. Systematic functional analysis of active-site residues in L-threonine dehydrogenase from *Thermoplasma volcanium*. *ACS Omega*, 2017, 2(7): 3308-3314.
- [9] Liu JH, Li HL, Zhao GR, et al. Redox cofactor engineering in industrial microorganisms: Strategies, recent applications and future directions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(5): 313-327.
- [10] Aller K, Adamberg K, Reile I, et al. Excess of threonine compared with serine promotes threonine aldolase activity in *Lactococcus lactis* IL1403. *Microbiology*, 2015, 161(5): 1073-1080.
- [11] Adjogatse E, Erskine P, Wells SA, et al. Structure and function of L-threonine-3-dehydrogenase from the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei* revealed by X-ray crystallography and geometric simulations. *Acta Crystallog Sect D*, 2018, 74(9): 861-876.
- [12] Marcus JP, Dekker EE. Threonine formation via the coupled activity of 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A lyase and threonine dehydrogenase. *J Bacteriol*, 1993, 175(20): 6505-6511.

- [13] Elovaara H, Huusko T, Maksimow M, et al. Primary amine oxidase of *Escherichia coli* is a metabolic enzyme that can use a human leukocyte molecule as a substrate. PLoS ONE, 2015, 10(11): e0142367.
- [14] 李阳, 朱俊歌, 王建军, 等. 组合蛋白质工程和代谢工程设计全细胞催化剂合成靛蓝和靛玉红. 生物工程学报, 2016, 32(1): 41-50.
Li Y, Zhu JG, Wang JJ, et al. Biosynthesis of indigo and indirubin by whole-cell catalyst designed by combination of protein engineering and metabolic engineering. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 41-50 (in Chinese).
- [15] Mundhada H, Schneider K, Christensen HB, et al. Engineering of high yield production of L-serine in *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(4): 807-816.
- [16] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [17] Kim JW, Seo SO, Zhang GC, et al. Expression of *Lactococcus lactis* NADH oxidase increases 2,3-butanediol production in Pdc-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour Technol, 2015, 191: 512-519.
- [18] Bowyer A, Mikolajek H, Stuart JW, et al. Structure and function of the L-threonine dehydrogenase (TkTDH) from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. J Struct Biol, 2009, 168(2): 294-304.
- [19] Zhang GC, Turner TL, Jin YS. Enhanced xylose fermentation by engineered yeast expressing NADH oxidase through high cell density inoculums. J Ind Microbiol Biotechnol, 2017, 44(3): 387-395.
- [20] 曹艳丽, 张丽杰, 徐岩. 以 L-苏氨酸为发酵底物的 2,5-二甲基吡嗪高产菌株构建. 食品与发酵工业, 2020, 46(1): 1-10.
Cao YL, Zhang LJ, Xu Y. Biosynthesis of 2,5-dimethylpyrazine from L-threonine by a metabolically engineered strain. Food Fermentat Industri, 2020, 46(1): 1-10 (in Chinese)
- [21] Chen XL, Li SB, Liu LM. Engineering redox balance through cofactor systems. Trans Biotechnol, 2014, 32(6): 337-343.

(本文责编 郝丽芳)