

组成型天冬氨酸转氨酶基因工程菌的构建与高效表达

宫长斌, 徐 娴, 李 霜, 何冰芳

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘 要: 天冬氨酸转氨酶 AspAT 是苯丙酮酸转氨制备 L-苯丙氨酸的关键酶。本研究将大肠杆菌中天冬氨酸转氨酶基因 *aspC* 克隆到 3 种不同质粒中, 构建组成型表达质粒 pUC/P-*aspC*, pSE/P-*aspC*, pET/P-*aspC*, 并分别转化至 6 种常用的大肠杆菌宿主中。通过对 18 种重组子的生长及产酶情况的分析, 比较了各种重组子生长压力、质粒稳定性与表达酶活的关系, 并经 SDS-PAGE 电泳分析 AspAT 的表达量, 筛选出高产 AspAT 的重组子 BL21(pET/P-*aspC*), 以该工程菌发酵液直接作为酶液, 以天冬氨酸和苯丙酮酸(20 g/L)为底物, 发酵液与底物以 1:3 的体积比转化生成 L-苯丙氨酸 16.2 g/L, 转化率高达 80.1%。该体系表达无需诱导, 转化无需添加辅酶 PLP, 展现了良好的产业化前景。

关键词: 组成型表达; 天冬氨酸转氨酶基因; 天冬氨酸转氨酶; L-苯丙氨酸; 磷酸吡哆醛

中图分类号: TQ92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2007)03-0574-05

1 前 言

L-苯丙氨酸(L-Phe)广泛应用于医药、化工等行业, 是甜味剂阿斯巴甜(APM)的主要原料。国内外市场对 L-苯丙氨酸的需求量很大, 全球约为(2.0~2.5)×10⁴ t/a, 我国需求量在 2000 t/a 以上。虽然国内也有小规模生产的报道, 但主要依赖进口^[1]。因此开发具有自主知识产权的 L-苯丙氨酸生产技术具有重要的现实意义。

L-苯丙氨酸的制备工艺路线有多条, 日本、韩国等主要采用发酵法, 国内尚未建立高效的发酵制备工艺, 主要采用肉桂酸法^[2]和海因法^[3]。海因法是将化学合成和生物酶法催化相结合, 从海因合成亚苄基海因, 再水解产生苯丙酮酸(Phenylpyruvate, PPA), 以苯丙酮酸为前体, 以天冬氨酸作为氨基供体, 通过天冬氨酸转氨酶(Aspartate Aminotransferase, AspAT)转氨制备 L-苯丙氨酸。该路线原料易于制备, 方法较为简便。徐虹等^[4]经过多年研究, 已从根本上解决了 PPA 的生产问题。催化 PPA 转氨制备 L-Phe 的生产菌选育也取得了重大的突破^[4-6], 但在实际生产中还存在一些问题, 如噬菌体的突发等。高效表达天冬氨酸转氨酶的实用性工程菌的构建是保证该工艺路线的关键。

利用分子生物学手段构建高效表达天冬氨酸转氨酶(AspAT)的基因工程菌及其外源基因高效表达的调控研究受到了众多科学家的关注。1986 年英国 Orherrin 等率先克隆并测定了大肠杆菌中编码天冬氨酸转氨酶的基因 *aspC*^[7,8]。史燕东等^[7]构建的 CTB2 菌以 PPA 为底物, 产率为 81%, L-苯丙氨酸浓度达 14.4 g/L 以上。Chao

等^[9]将天冬氨酸转氨酶的基因 *aspC* 和天冬氨酸酶的基因 *aspA* 克隆到同一个 *E. coli* 菌株中, 以富马酸和苯丙酮酸为底物, 利用双酶耦合体系制备 L-Phe, 在苯丙酮酸终浓度 20 g/L 时, 转化率达到 78%。2001 年 Chao 等^[10]重新构建了一双酶体系, 将磷酸烯醇丙酮酸羧激酶与天冬氨酸转氨酶同时表达, 通过分解转氨反应的副产物草酰乙酸, 提高了转化率。但以上报道中的转氨酶催化反应体系均需添加昂贵的辅酶磷酸吡哆醛(Pyridoxal 5'-Phosphate, PLP), 且在上述基因工程菌中外源基因的表达多采用诱导型启动子, 利用 IPTG 等诱导剂, 有较大毒性且价格昂贵^[11,12], 缺乏实际应用价值。此外多数基因工程菌在实际使用中还存在质粒的稳定性、目的基因的高效可溶性表达等问题^[13,14]。天冬氨酸转氨酶转化制备 L-Phe 等反应体系需要辅酶, 宿主能否提供足够的辅酶或是否具有有良好的辅酶再生体系等均是制约工程菌实用性的瓶颈。

本研究构建了 18 种组成型表达天冬氨酸转氨酶的基因工程菌, 考察了宿主与质粒的适应性, 特别是不同宿主中质粒稳定性及外源基因的表达活力等。筛选得到了高效表达转氨酶的重组子, 该基因工程菌的发酵无需 IPTG 或乳糖的诱导, 反应体系不需添加辅酶 PLP。培养后可直接利用发酵液转化, 转化率高, 具有较高的实用价值。

2 材 料 和 方 法

2.1 质粒与菌株

表达载体 pUC19, pET22b 由本实验室保存, 载体

收稿日期: 2006-09-21, 修回日期: 2006-12-20

基金项目: 国家自然科学基金重点基金资助项目(编号: 20336010); 江苏省高校高新技术产业发展基金资助项目(编号: JH03-048)

作者简介: 宫长斌(1975-), 男, 山东省夏津县人, 硕士, 助教, 主要从事生物催化研究; 何冰芳, 通讯联系人, Tel: 025-83587336, E-mail: bingfanghe@njut.edu.cn.

pSE380 由广西大学黄日波教授赠送. 宿主菌大肠杆菌 BL21(DE3), JM109, DH-5 α , TOP-10F, Sure, XL1-blue 均由本实验室保存.

2.2 试剂

限制性内切酶 *EcoRI*, *HindIII* 购自大连 TaKaRa 公司, 苯丙酮酸由本院生产^[4], L-天冬氨酸购自常州常茂生物化学工程公司, 磷酸吡哆醛(PLP)为 Sigma 公司产品. 其他试剂均为国产分析纯产品.

2.3 引物设计

根据大肠杆菌 K12 基因组上天冬氨酸转氨酶基因序列, 设计引物如下:

aspC F: ATAAAGCTTGATGTTTGAGAACATTACCG,

aspC R: CATGAATTCCTTACAGCACTGCCACAATCG.

2.4 分子克隆操作及方法

质粒 DNA 的分离纯化、感受态细胞的制备和质粒的转化方法等参考文献[15]及试剂盒说明书进行, 质粒快检方法见文献[16].

2.5 培养基及培养方法

本研究中培养基选用 LB 培养基^[15]. 将重组菌由平板接种至液体 LB 培养基(Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中培养 8 h 后, 以 3%的接种量转接至液体 LB 培养基(Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 转速下培养 10 h. 发酵液直接用于酶活测定或转化反应.

2.6 分析方法

天冬氨酸转氨酶的酶活测定采用三价铁离子显色法^[4], 以 PPA 的减少量折算成转氨酶活力. 取 1 mL 发酵液, 加入 1% CTAB, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min, 加入 1 mL 底物(PPA 0.1 mol/L, L-Asp 0.11 mol/L, 氨水调节 pH 8.5), 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h. 取 20 μL 反应液到 5 mL 显色液(DMSO 600 mL, 冰醋酸 20 mL, FeCl_3 0.5 g, 双蒸水定容至 1 L)

中, 在一定浓度范围内在 640 nm 处的吸光值与底物 PPA 的含量成正比.

定义 1 mL 发酵液 1 h 转化 1 μmol PPA 所需酶量为一个比酶活单位(U/mL).

苯丙氨酸及苯丙酮酸定量测定采用高效毛细管电泳(HPCE)法^[4,6].

天冬氨酸转氨酶基因 *aspC* 的表达产物鉴定: 3 种重组菌培养后, 发酵液破壁后离心取上清, 测定上清的蛋白含量, 调整每道蛋白量相近, 进行 SDS-PAGE 电泳^[14].

2.7 转化苯丙酮酸 PPA 制备 L-Phe

底物配制: 直接采用亚苄基海因水解液(含高浓度 PPA, pH 调整到 7.2)为底物, PPA 和 L-Asp 的摩尔比 1:1.1, PPA 浓度约 27 g/L, 氨水调节 pH 至 8.5.

转化制备 L-Phe: 取 2.5 节中的发酵液 20 mL 直接用作粗酶液进行转化反应, 按发酵液:底物=1:3 的体积比混合, 反应体系中 PPA 浓度为 20 g/L. 置于 150 mL 摇瓶中充 N_2 后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 120 r/min 转化 12 h. 采用 HPCE 法测定转化液中 L-苯丙氨酸生成量和 PPA 的减少量.

3 结果与讨论

3.1 天冬氨酸转氨酶基因 *aspC* 的克隆与表达载体的构建

将 pUC19 载体上乳糖操纵子的转录起始部位的正 5~+17 间的几处碱基进行突变^[17], 变为组成型启动子 P121(含 SD 位点, 相关启动子构建已申请专利, 专利号: CN 1757737A). 以引物 *aspC* F 和 *aspC* R 扩增出天冬氨酸转氨酶基因 *aspC*(约 1500 bp), 通过 *HindIII* 和 *EcoRI* 双酶切之后与带有 P121 启动子的 pUC19 相连, 形成重组质粒 pUC/P-*aspC*. 具体构建流程见图 1. pET/P-*aspC*, pSE/P-*aspC* 采用相同方法构建.

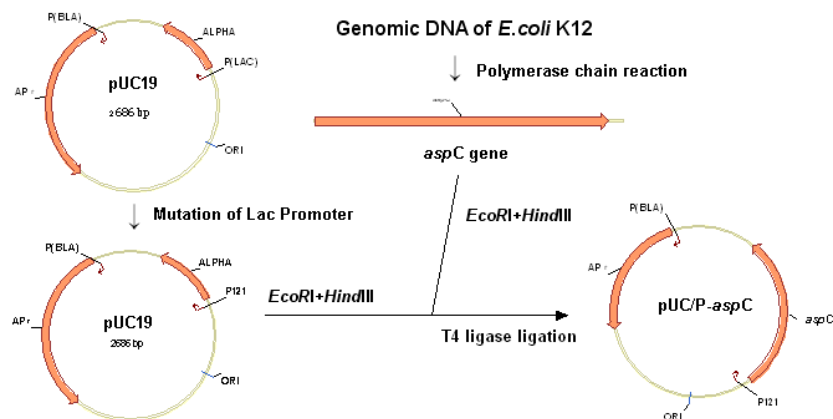


图1 重组载体构建流程图

Fig.1 Construction of recombinant plasmid

将构建的重组质粒 pUC/P-*aspC*, pET/P-*aspC*, pSE/P-*aspC* 进行 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切, 图 2 显示 3 种重组子在 1500 bp 左右比空载体多出一条带, 与插入的外源基因 *aspC* 大小一致, 表明外源基因已成功分别插入到 3 个载体中。

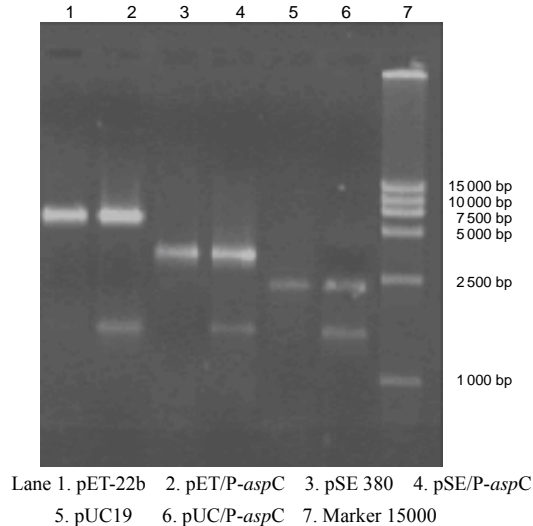


图 2 重组质粒的 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切电泳图
Fig.2 Digestion of recombinant plasmid by *Hind*III and *Eco*RI

3.2 组成型天冬氨酸转氨酶工程菌的构建与表达

将 3 种重组质粒分别转化至 *E. coli* BL21, JM109, DH-5 α , TOP10-F, Sure, XL1-Blue 宿主菌中, 获得 18 种重组子, 每种重组子选取 5 个阳性克隆, 其平均比酶活见表 1. 3 种质粒以 BL21, XL1-Blue 作为宿主时的比酶活普遍高于另 4 种宿主. 在 6 种宿主中导入载体 pET/P-*aspC* 的重组子的酶活高于另外 2 种重组子, 酶活高低次序为 pET/P-*aspC*>pSE/P-*aspC*>pUC/P-*aspC*. 因此确定 BL21(pET/P-*aspC*)为最佳重组子. 针对相同宿主中导入不同载体重组子的酶活差异, 进一步选用转化子 BL21(pUC/P-*aspC*), BL21(pSE/P-*aspC*), BL21(pET/P-*aspC*) 研究不同质粒在宿主中的稳定性、适应性与表达效率。

表 1 各种重组子的 AspAT 比酶活

Table 1 Activity of transaminase in recombinant <i>E. coli</i> (U/mL)				
<i>E. coli</i> strain	<i>E. coli</i> strain	pET/P- <i>aspC</i>	pSE/P- <i>aspC</i>	pUC/P- <i>aspC</i>
BL21	14.1	83.9	80.3	74.1
JM109	15.2	64.8	71.0	55.2
DH-5 α	12.1	69.1	56.8	62.1
TOP10F	14.0	61.8	59.2	54.0
Sure	13.4	72.1	61.3	63.4
XL1-blue	10.2	79.2	79.0	70.2

3.3 不同载体对天冬氨酸转氨酶表达的影响

拷贝数是影响外源基因稳定性及表达效率的重要因素, 本研究对筛选到的重组子 BL21(pUC/P-*aspC*), BL21(pET/P-*aspC*), BL21(pSE/P-*aspC*) 进行培养后取相

同生物量细胞进行质粒快检, 电泳结果见图 3. 电泳条带经凝胶成像系统扫描分析重组质粒在细胞中的 DNA 含量比约为 pUC/P-*aspC*:pSE/P-*aspC*:pET/P-*aspC*=25:5:1, 3 种重组质粒碱基含量为 pUC/P-*aspC* 4171 bp, pSE/P-*aspC* 5795 bp, pET/P-*aspC* 6712 bp, 对比质粒在细胞中的 DNA 含量和大小, 表明 3 种重组质粒在宿主 *E. coli* BL21 中的复制程度比为 pUC/P-*aspC*:pSE/P-*aspC*:pET/P-*aspC*=112:17:3(该数据仅提供粗略估计), 表明了 pET 载体在细胞中的拷贝数远低于另外 2 种载体. 而 3 种重组子的酶活为 BL21(pET/P-*aspC*)>BL21(pSE/P-*aspC*)>BL21(pUC/P-*aspC*), 与质粒的拷贝数成反比. 这可能是带有组成型外源基因载体的重组子增加了载体的拷贝数, 加大了对宿主的生长压力, 不利于外源基因的稳定与高效表达。

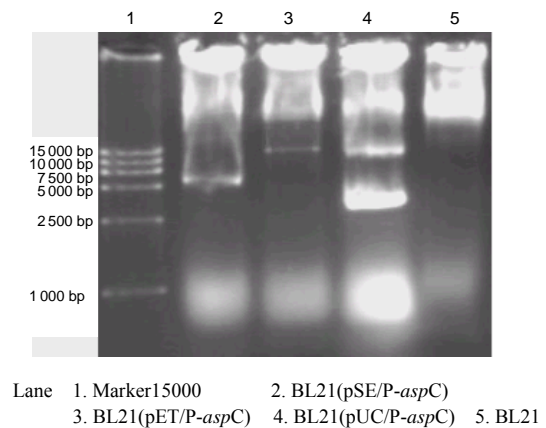


图 3 质粒快检电泳图谱
Fig.3 Simple assays of recombinant plasmids

3 种重组子的生长曲线以及产酶曲线(见图 4)表明重组菌 BL21(pET/P-*aspC*)生长情况略优于另外 2 株重组菌, 重组菌 BL21(pET/P-*aspC*)虽然生长初期 AspAT 表达量低, 表达的高峰期较为滞后, 但最终单位发酵液酶活高于其他 2 株菌, 这可能是质粒拷贝数低、稳定性高所致. 重组菌 BL21(pET/P-*aspC*)的酶活分别是 BL21(pSE/P-*aspC*)的 120%, BL21(pUC/P-*aspC*)的 140%. 图 4 中显示的生长情况与质粒拷贝数的推测呈相反的趋势, 说明高拷贝质粒给宿主的生长带来较大的压力. BL21(pUC/P-*aspC*)的生长在 14 h 后突然上升, 但相应酶活反而下降, 这可能是在此阶段有部分 pUC/P-*aspC* 质粒从宿主中掉下后空宿主快速生长所致。

3 种重组菌发酵后的粗酶液经 SDS-PAGE 分析在 42 kDa 处均有显著的天冬氨酸转氨酶表达蛋白条带(见图 5), BL21(pET/P-*aspC*)重组子的表达量略低于另 2 种重组子, 第 4 泳道空宿主在相同位置无明显的条带. 结

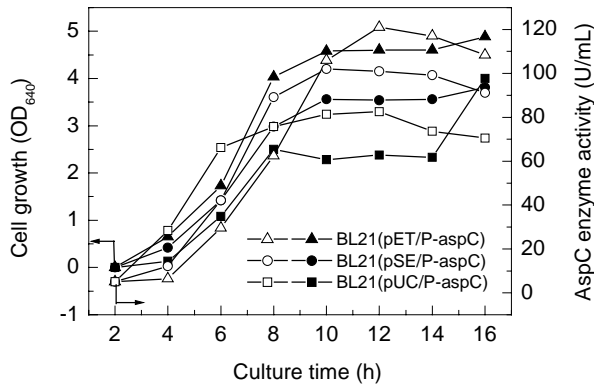


图 4 三种重组子的生长及产酶曲线
Fig.4 Cell growth and AspAT activity of recombinant BL21

合图 3 和 4 可以推断, 由于 pET/P-aspC 质粒在宿主中拷贝数较低, 酶蛋白表达量相对较低, 对宿主生长的压力较低, 所以 BL21(pET/P-aspC) 生长优于其他 2 株菌, 最终单位发酵液的酶活总量高于其他 2 株菌。

3.4 生物转化制备 L-Phe 与辅酶依赖性实验

磷酸吡哆醛 PLP 作为转氨酶必需的辅酶, 价格昂贵, 采用基因工程菌进行转化通常需要添加辅酶^[9,10], 一直是天冬氨酸转氨酶催化 PPA 制备苯丙氨酸较难解决的制约因素之一。本研究同时考察了 3 种重组菌对 PLP 的依赖性。取发酵培养后的 3 种重组菌的 LB 发酵液, 分别添加辅酶磷酸吡哆醛(PPA 10 μmol/mL)后转化, 以不添加辅酶的作对照, 结果见表 2, 表明辅酶磷酸吡哆醛的添加与否对转化率基本无影响, 说明 3 种重组菌的静息细胞转化体系产生的辅酶 PLP 足够供该酶完成单批次催化转氨的需要。辅酶如何再生及能否实现持续转化还有待深入研究。

表 2 PLP 对 L-Phe 转化率的影响

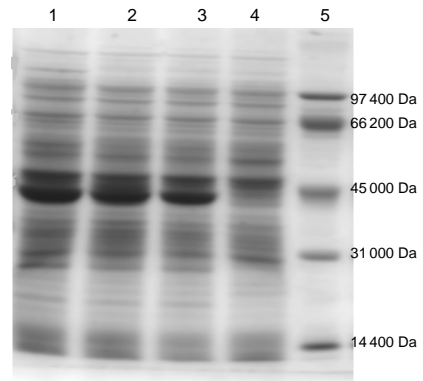
System	BL21(pET/P-aspC)	BL21(pSE/P-aspC)	BL21(pUC/P-aspC)
-PLP	80.1	78.2	75.8
+PLP	80.9	78.8	76.2

4 结论

采用组成型表达体系, 并通过对 3 种载体分别在 6 个不同宿主中的适应性、宿主内复制程度及外源基因表达的探讨, 筛选出可组成型高效表达天冬氨酸转氨酶的基因工程菌 BL21(pET/P-aspC), 并得出以下结论:

(1) 采用了 3 种载体、6 种宿主表达带有组成型启动子的外源基因 P-aspC, 质粒拷贝数相对较低的载体更利于外源基因的高效表达。确定了表达最优体系载体为 pET22b, 宿主菌为 *E. coli* BL21。

(2) 构建筛选出的 3 种重组菌发酵后其静息细胞均



Lane 1. BL21(pUC/P-aspC) 2. BL21(pSE/P-aspC)
3. BL21(pET/P-aspC) 4. BL21 5. Marker

图 5 重组子表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig 5 SDS-PAGE analysis of recombinant AspAT

能产生一定量的辅酶 PLP, 在进行单批次转化时不需要外加辅酶。

(3) 重组工程菌 BL21(pET/P-aspC) 经发酵后, 直接以发酵液为酶液, 以天冬氨酸和苯丙酮酸(终浓度 20 g/L) 为底物进行转化, 生成 16.02 g/L 的 L-苯丙氨酸, 转化率最高达 80.1%。该体系发酵转化反应简便, 成本低廉, 体现了良好的产业化前景。

参考文献:

- [1] 吴广文, 梅付名, 李光兴, 等. L-苯丙氨酸制备的研究进展 [J]. 湖北化工, 2001, 18(1): 7-9.
- [2] 杨顺楷. L-苯丙氨酸酶法生产新工艺 [J]. 精细与专用化学品, 2001, 9(2): 18-19.
- [3] 毕洪书, 沈飞, 沈树宝, 等. 海因酶法制备 L-氨基酸研究进展 [J]. 精细与专用化学品, 2002, 10(22): 18-19.
- [4] 徐虹, 欧阳平凯. 大肠杆菌 EP8-10 转化苯丙酮酸生成 L-苯丙氨酸的研究 [J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 272-274.
- [5] 唐芳, 谭天伟, 王芳. L-天冬氨酸转化菌发酵条件的优化 [J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2003, 30(5): 21-24.
- [6] Xu H, Wei P, Zhou H, et al. Efficient Production of L-Ohenylalanine Catalyzed by a Coupled Enzymatic System of Transaminase and Aspartase [J]. Enzyme Microb. Technol., 2003, 33: 537-543.
- [7] 史燕东, 吴梧桐. 用 PCR 法从大肠杆菌 K12 菌株中克隆 tyrB 基因 [J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(6): 361-363.
- [8] 梁世中, 高河泳. 基因重组质粒稳定性与苯丙氨酸发酵的研究 [J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 1991, 19(3): 1-7.
- [9] Chao Y P, Lo T, Luo N. Selective Production of L-Aspartic Acid and L-Phenylalanine by Coupling Reactions of Aspartase and Aminotransferase in *Escherichia coli* [J]. Enzyme Microb. Technol., 2000, 27: 19-25.
- [10] Chao Y P, Lai Z J, Chen P, et al. Enhanced Conversion Rate of L-Phenylalanine by Coupling Reactions of Aminotransferases and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Escherichia coli* K-12 [J]. Biotechnol. Progr., 1999, 15(3): 453-458.
- [11] 娄恺, 于安峰, 邢新会. 重组大肠杆菌生产极端耐热木聚糖酶 [J]. 过程工程学报, 2004, 4(5): 445-450.
- [12] 李兆鹏, 张栩, 徐斌, 等. 重组大肠杆菌高密度发酵中乳糖诱导表达 hBLyS [J]. 过程工程学报, 2005, 5(4): 446-449.
- [13] 喻国策, 焦瑞身, 王骥成, 等. 大肠杆菌 *E. coli* HB101(pBR322)

- 高密度培养过程质粒的稳定性 [J]. 过程工程学报, 2001, 1(2): 185-188.
- [14] Johan P. Multieveled Selection on Plasmid Replication [J]. Genetics, 2002, 161: 1373-1384.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 拉赛尔 D W. 分子克隆手册, 第3版 [M]. 黄培堂, 金冬雁, 黎孟枫, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2004. 95-255.
- [16] 林涛, 曹学松, 李霜, 等. 一步法快速质粒鉴定方法 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(B04): 313-315.
- [17] Bautista D S, Graham F L. Insertional Mutagenesis Using a Synthetic Lac Operator [J]. Gene, 1989, 82(2): 201-208.

Cloning and Effective Constitutive Expression of *aspC* Gene in *Escherichia coli*

GONG Chang-bin, XU Xian, LI Shuang, HE Bing-fang

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: L-phenylalanine (L-Phe) can be prepared from phenylpyruvate (PPA) via an amination reaction mediated by aspartate aminotransferase (encoded by *aspC*) as the key enzyme. In this study, the *aspC* gene was cloned into plasmid pUC18, pSE 380 and pET-22b to construct three kinds of constitutive vectors, which were then transferred into 6 strains of *Escherichia coli*, respectively, to over-produce aminotransferase. From the transformants, the *E. coli* strain BL21(DE3) harboring plasmid pET/P-*aspC* showing the highest activity was scored and designated BL21(pET/P-*aspC*). With L-Asp and PPA (20 g/L) as substrates, the conversion rate reached 80.1% after eight-hour reaction, approaching the theoretical yield. This system had good industrial prospects because no inducer or coenzyme was needed. Furthermore, the results showed the potential of gene engineering on strain selections.

Key words: constitutive expression; *aspC*; aspartate aminotransferase (AspAT); L-phenylalanine (L-Phe); pyridoxal 5'-phosphate (PLP)