

三酶偶联全细胞生物合成 L-酪氨酸

陈明亮¹, 张利坤¹, 杨卫华¹, 唐云平², 肖延铭^{1*}

(1. 长兴制药股份有限公司, 浙江 长兴 313100; 2. 浙江海洋大学 食品与医药学院, 浙江 舟山 316022)

摘要: 通过将醛缩酶 (ALD)、D-丝氨酸脱水酶 (SDH) 和酪氨酸酚裂解酶 (TPL) 三酶偶联, 催化甘氨酸、甲醛和苯酚合成 L-酪氨酸 (L-Tyr)。并以 L-Tyr 的质量浓度为指标对转化工艺进行了考察。结果表明: 三酶偶联最佳反应条件为 pH=8.5、温度 35 °C、乙酸铵质量分数 6 g/L、磷酸吡哆醛 (PLP) 质量浓度 0.1 g/L、3 种酶细胞配比 $m(\text{ALD}) : m(\text{SDH}) : m(\text{TPL}) = 6 : 3 : 5$ 。当甘氨酸加量为 50 g/L, 利用上述工艺进行 10000 L 放大, 反应 11 h, L-Tyr 质量浓度可达 117 g/L, 苯酚转化率为 97%, 转化体系放大后苯酚转化率提高 4%, 收率为 85%。

关键词: 酶偶联; 醛缩酶; D-丝氨酸脱水酶; 酪氨酸酚裂解酶; L-酪氨酸; 生物工程

中图分类号: TQ28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2019) 03-0455-06

Biosynthesis of L-Tyrosine with Aldolase, D-Serine Dehydratase and Tyrosine Phenol-Lyase

CHEN Ming-liang¹, ZHANG Li-kun¹, YANG Wei-hua¹, TANG Yun-ping², XIAO Yan-ming^{1*}

(1. Changxing Pharmaceutical Co., Ltd., Changxing 313100, Zhejiang, China; 2. School of Food Science and Pharmaceutics, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China)

Abstract: L-tyrosine (L-Tyr) was synthesized by three enzyme coupled catalysis. Glycine was catalyzed to synthesize D-serine by aldolase (ALD). Subsequently, D-serine dehydratase (SDH) converted D-serine into pyruvic acid ammonium. Then, L-Tyr was synthesized by tyrosine phenol-lyase (TPL) when the substrate phenol was added into the reaction system. The synthetic conditions for L-Tyr were investigated by using mass concentration of L-Tyr as evaluation index. The optimal reaction conditions were obtained as follows: pH=8.5, reaction temperature 35 °C, 6 g/L ammonium acetate, 0.1 g/L pyridoxal phosphate (PLP), $m(\text{ALD}) : m(\text{SDH}) : m(\text{TPL}) = 6 : 3 : 5$. The above conditions were used to catalyze glycine (50 g/L) for 11 h, the mass concentration of L-Tyr could reach 117 g/L. The phenol conversion increased by 4% after amplification of the conversion system and the yield of L-Tyr reached 85%.

Key words: three enzyme coupling; aldolase; D-serine dehydratase; tyrosine phenol-lyase; L-tyrosine; biological engineering

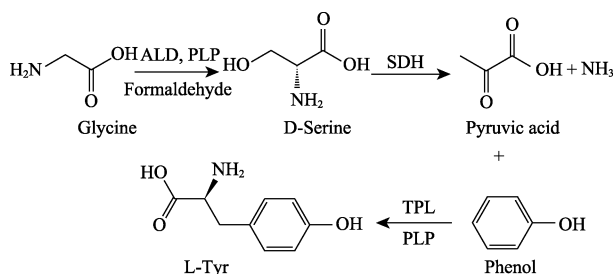
L-酪氨酸 (L-Tyr) 是一种芳香族天然氨基酸, 是动物体内合成蛋白质所需要的重要氨基酸之一^[1]。在医药领域^[2]、食品领域和临床应用上^[3]都有非常重要的作用。目前, L-Tyr 的制备方法主要有提取法^[4-6]、化学合成法、直接发酵法^[7-8]和生物酶催化法。提取法分离出高纯度的 L-Tyr 非常困难, 效率较低。化学合成法步骤多、手性差^[9]。直接发酵法过程复杂、产酸率低^[10]。生物酶催化法具有专一性强、反应条件温和、周期短、易分离纯化等优点,

是目前生产 L-Tyr 的最为经济有效的方法^[11]。

酪氨酸酚裂解酶 (TPL), 也称 β -酪氨酸酶, 可以将苯酚、丙酮酸和氨转化为 L-Tyr^[12]。Para 等^[11]通过包埋法积累 L-Tyr 质量浓度达到 10 g/L。Lee 等^[3]用 L-丝氨酸路线积累 L-Tyr 质量浓度达到 26.3 g/L, 但该工艺存在甘氨酸对 TPL 抑制较强和操作复杂的明显不足。丙酮酸是 TPL 合成 L-Tyr 的关键底物之一, 但其作为一种日化中间体, 国内外市场需求增长极其迅速, 价格居高不下。化学法生产丙酮酸污

染大、成本高；发酵法生产丙酮酸转化率低、操作繁琐易染菌、生产周期长^[13]。因此，寻求能够廉价生产丙酮酸的方法意义重大。

本文首先通过一锅酶法，将底物甘氨酸、甲醛和苯酚经分别来源于 *Achromobacter spanius* 的醛缩酶 (ALD, EC4.1.2.13)、*Bacillus subtilis* 的 D-丝氨酸脱水酶 (SDH, EC4.3.1.18) 和 *Citrobacter freundii* 的 TPL (EC4.1.99.2) 三酶催化反应得到产物 L-Tyr，然后优化了转化工艺条件；最后，利用该工艺进行中试放大验证，并考察了 L-Tyr 的收率，反应式如下所示。该三酶偶联体系中，通过 ALD 和 SDH 的联用生成丙酮酸，且该体系避免了 D-丝氨酸和丙酮酸的提取步骤，节省反应时间、提高效率，大大降低了 L-Tyr 的生产成本，有望解决丙酮酸成本高的问题。



1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 菌种与试剂

基因工程重组菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET26b-ALD、*E.coli* BL21(DE3)/pET26b-SDH 和 *E.coli* BL21(DE3)/pET26b-TPL，长兴制药股份有限公司研发中心分子平台构建并保存；甘氨酸、苯酚，AR，国药集团化学试剂有限公司；磷酸吡哆醛，AR，西格玛公司；卡那霉素 (Kana)，AR，上海生工生物工程股份有限公司；其他常规试剂均为市售分析纯。

1.1.2 培养基

LB(Luria-Bertani 培养基)/Kana 斜面培养基：蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，NaCl 5 g/L，琼脂粉 20 g/L。调节 pH=7.2，121 °C 灭菌 20 min。待培养基冷却至 40~50 °C，添加事先配制成一定浓度过滤除菌后的 Kana，使其终质量浓度为 50 mg/L，制作斜面。

TB(Terrific Broth 肉汤培养基)/Kana 培养基：蛋白胨 12 g，酵母提取物 24 g，甘油 4 mL，溶解于 0.9 L 水中，121 °C 灭菌 20 min。待其冷却到 60 °C，再加入 100 mL 灭菌后含有 0.17 mol/L KH₂PO₄ 和 0.72 mol/L K₂HPO₄ 的溶液，并添加事先配制成一定浓度过滤除菌后的 Kana，使其终质量浓度为 50 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 菌体细胞制备

将上述 3 个菌种分别接于 LB 斜面 37 °C 培养 8 h，然后用接种环从 LB 斜面上刮取菌体接入装有 50 mL TB/Kana 培养基的 250 mL 三角瓶中培养 8 h，再将活化好的种子液接入装有 100 mL TB/Kana 培养基的 500 mL 三角瓶中，接种量为体积分数 0.8%~1.2%。37 °C 摇床培养至菌体 OD₆₀₀ 为 4.0~6.0，加入终浓度 0.3 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)，28 °C 诱导 12 h。发酵结束后于 5000 r/min 离心 15 min，收集菌体细胞，分别得到 3 种细菌的菌泥。

1.2.2 三酶偶联反应

500 mL 反应体系：向 1 L 三口烧瓶中加入水 350 mL、甘氨酸 25 g (0.3 mol)、磷酸吡哆醛 (PLP) 0.05 g (0.2 mmol)、甲醛 4 g (0.13 mol)、无水 Na₂SO₃ 1.2 g (9.5 mmol)、EDTA 1.2 g (4.1 mmol)、乙酸铵 3 g (0.039 mol)、用 NaOH 稀溶液将 pH 控制在 8.4~8.6，再加入 30 g 产 ALD 菌体细胞、15 g 产 SDH 菌体细胞、25 g 产 TPL 菌体细胞，温度控制在 33~37 °C。以 50 mg/min 的速度流加苯酚，开始反应，反应过程中用甲醛将 pH 控制在 8.4~8.6。流加完 31.5 g 苯酚后再继续搅拌反应 30 min，停止反应。利用 HPLC 检测转化液中苯酚的残留以及 L-Tyr 生成量。

1.2.3 ALD 酶活测定

取 0.1 g 产 ALD 细胞菌体，加入 10 mL 反应体系：甘氨酸质量分数 1%，甲醛质量分数 1%，4 mmol/L PLP，稀盐酸调 pH=8.5，35 °C，200 r/min 条件下进行酶促反应，10 min 取样，用浓盐酸终止酶促反应，利用 HPLC 检测反应液中 D-丝氨酸的浓度。酶活定义为上述条件下每分钟内催化生成 1 μmol D-丝氨酸所需要的酶量为一个酶活单位 (U)。

D-丝氨酸色谱条件：Daicel CROWNPAKCR(+) 色谱柱 (150 mm×4 mm)；流速 0.3 mL/min；柱温 30 °C；检测波长 200 nm；流动相 pH=1.0 的高氯酸水溶液^[14]。

1.2.4 SDH 酶活测定

取 0.1 g 产 SDH 细胞菌体，加入 10 mL 反应体系：D-丝氨酸质量分数 1%，稀盐酸调 pH=8.5，35 °C，200 r/min 条件下进行酶促反应，10 min 取样，用浓盐酸终止酶促反应，利用 HPLC 检测反应液中丙酮酸的浓度。酶活定义为上述条件下每分钟内催化生成 1 μmol 丙酮酸所需要的酶量为一个酶活单位 (U)。

丙酮酸色谱条件：色谱柱 WondaSil C18 柱 (250 mm×4.6 mm×5 μm)；流动相 V [5.5 mmol/L 二环己胺和 0.02 mol/L 的甲酸水溶液] : V (乙腈) = 95 : 5；检测波长 230 nm；流速 0.6 mL/min；进样

量 20 μL ; 柱温为室温^[15]。

1.2.5 TPL 酶活测定

取 0.1 g 产 TPL 细胞菌体, 加入 10 mL 反应体系: 丙酮酸质量分数 1%, 苯酚质量分数 1%, 4 mmol/L PLP, 氨水调 pH=8.5, 温度为 35 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 条件下进行酶促反应, 10 min 取样, 用浓盐酸终止酶促反应, 利用 HPLC 检测反应液中 L-Tyr 的浓度。酶活定义为上述条件下每分钟内催化生成 1 μmol L-Tyr 所需要的酶量为一个酶活单位 (U)。

苯酚以及 L-Tyr 色谱条件: 色谱柱 WondaSil C18 柱 (250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm); 流动相 V [8.5 mmol/L 醋酸钠溶液(磷酸调节至 pH=4.0)] : V (甲醇)=4 : 1; 检测波长 230 nm; 流速 0.6 mL/min; 进样量 20 μL ; 柱温为室温^[16]。

转化率以苯酚计, 计算公式为:

$$X/\% = \frac{C \times 94.11}{P \times 181.19} \times 100$$

式中: X 为底物转化率, %; C 为转化结束时转化液中 L-Tyr 的质量浓度, g/L; P 为转化结束时加入苯酚的总质量浓度, g/L; 94.11 为苯酚的相对分子质量; 181.19 为 L-Tyr 的相对分子质量。

1.3 单因素考察

1.3.1 pH 对酶活的影响

pH 对 ALD 酶活的影响: 向 10 mL 含有 0.1 g 甘氨酸、0.1 g 甲醛和 9.88 mg PLP 的水溶液中加入产 ALD 细胞菌体 0.1 g, 温度 35 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 搅拌速度, 不同 pH 条件下进行酶促反应, 10 min 取样, 用浓盐酸终止酶促反应, 利用 HPLC 检测反应液中 D-丝氨酸的浓度。

pH 对 SDH 酶活的影响: 向 10 mL 含有 0.1 g D-丝氨酸的水溶液中加入产 SDH 细胞菌体 0.1 g, 温度 35 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 搅拌速度, 不同 pH 条件下进行酶促反应, 10 min 取样, 用浓盐酸终止酶促反应, 利用 HPLC 检测反应液中丙酮酸的浓度。

pH 对 TPL 酶活的影响: 向 10 mL 含有 0.1 g 丙酮酸、0.1 g 苯酚和 9.88 mg PLP 的水溶液中加入产 TPL 细胞菌体 0.1 g, 温度 35 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 搅拌速度, 不同 pH 条件下进行酶促反应, 10 min 取样, 用浓盐酸终止酶促反应, 利用 HPLC 检测反应液中 L-Tyr 的浓度。

1.3.2 温度对酶活的影响

温度对 ALD 酶活的影响: 向 10 mL 含有 0.1 g 甘氨酸、0.1 g 甲醛和 9.88 mg PLP 的水溶液中加入产 ALD 细胞菌体 0.1 g, pH=8.5, 200 r/min 搅拌速度, 不同温度条件下进行酶促反应, 10 min 取样, 用浓盐酸终止酶促反应, 利用 HPLC 检测反应液中 D-丝氨酸的浓度。

温度对 SDH 酶活的影响: 向 10 mL 含有 0.1 g D-丝氨酸的水溶液中加入产 SDH 细胞菌体 0.1 g, pH=8.5, 200 r/min 搅拌速度, 不同温度条件下进行酶促反应, 10 min 取样, 用浓盐酸终止酶促反应, 利用 HPLC 检测反应液中丙酮酸的浓度。

温度对 TPL 酶活的影响: 向 10 mL 含有 0.1 g 丙酮酸、0.1 g 苯酚和 9.88 mg PLP 的水溶液中加入产 TPL 细胞菌体 0.1 g, pH=8.5, 200 r/min 搅拌速度, 不同温度条件下进行酶促反应, 10 min 取样, 用浓盐酸终止酶促反应, 利用 HPLC 检测反应液中 L-Tyr 的浓度。

1.3.3 投酶量的确定

ALD 投酶量: 在 pH=8.5、温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 下, 向 100 mL 含有 0.05 mol 甘氨酸、0.13 mol 甲醛和 0.4 mmol PLP 的水溶液中加入不同浓度的产 ALD 细胞菌体, 转化生成 D-丝氨酸, 测定 1 h 产生的 D-丝氨酸量。

SDH 投酶量: 向 100 mL 含有 0.05 mol D-丝氨酸的水溶液中加入不同浓度的产 SDH 细胞菌体, 转化生成丙酮酸, 测定 1 h 产生的丙酮酸量。

TPL 投酶量: 向 100 mL 含有 0.05 mol 丙酮酸、0.05 mol 苯酚和 0.4 mmol PLP 的水溶液中加入不同浓度的产 TPL 细胞菌体, 转化生成 L-Tyr, 测定 1 h 产生的 L-Tyr 量。

1.3.4 乙酸铵对 L-Tyr 产量的影响

在 pH=8.5、温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 向 100 mL 含有 2.1 g 甘氨酸、2.1 g 甲醛、2.6 g 苯酚、98.8 mg PLP、6 g ALD、3 g SDH 和 5 g TPL 的水溶液中加入不同浓度的乙酸铵进行催化反应, 考察不同乙酸铵浓度对 L-Tyr 产量的影响。

1.3.5 PLP 浓度对 L-Tyr 产量的影响

在 pH=8.5、温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 向 100 mL 含有 2.1 g 甘氨酸、2.1 g 甲醛、2.6 g 苯酚、0.6 g 乙酸铵、6 g ALD、3 g SDH 和 5 g TPL 的水溶液中加入不同浓度的 PLP 进行催化反应, 考察不同 PLP 浓度对 L-Tyr 产量的影响。

2 结果与讨论

2.1 pH 对三酶偶联反应的影响

改变反应 pH, 其他条件参考 1.3.1, 以在不同 pH 条件下测得的最高酶活为 100%, 分别计算 3 种酶的各自相对酶活, 结果如图 1 所示。

由图 1 可知, ALD 的适宜 pH=7.5, SDH 的适宜 pH=8.0, TPL 适宜 pH=8.5, 在 pH=7.5 时, SDH 和 TPL 的酶活较低, 在 pH=8.0 时 TPL 的酶活较低,

在 pH=8.5 时 3 种酶均具有较高的酶活。因为酶在不同 pH 下表现出不同的酶活，在其最适 pH 时，活性最强，酶促反应速度最大，低于最适 pH 或高于最适 pH 都会使酶活下降。三酶偶联时需要从整体考虑，选择适当的 pH 使得整体的催化效率最高，故选择 pH=8.5 作为反应条件。

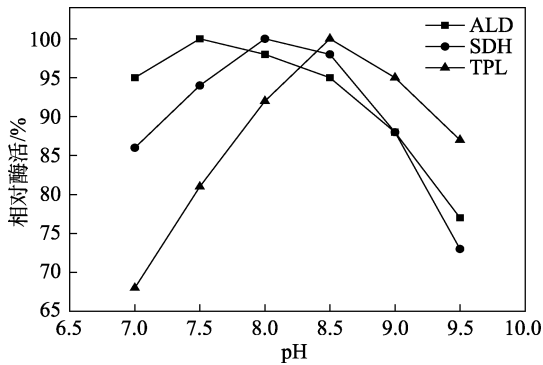


图 1 pH 对酶活的影响

Fig. 1 Effect of pH on the enzyme activity

2.2 温度对三酶偶联反应的影响

改变反应温度，其他条件参考 1.3.2，以在不同温度下测得的最高酶活为 100%，分别计算 3 种酶的各自相对酶活，结果如图 2 所示。

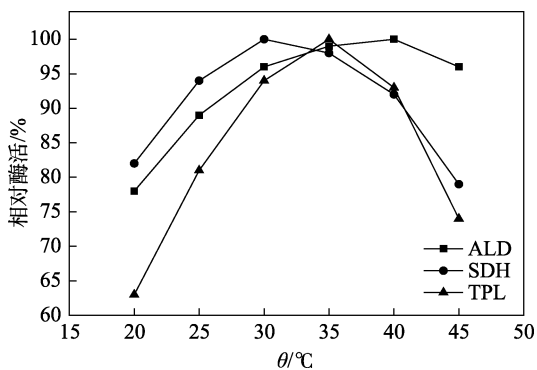


图 2 温度对酶活的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the enzyme activity

由图 2 可知，综合 3 种酶酶活随温度的变化曲线，选择 35 °C 作为催化体系的反应温度。因为酶在不同温度下表现出不同的酶活，在其最适温度范围内，活性最强，酶促反应速度最大，低于最适温度或高于最适温度都会使酶活下降。三酶偶联时需要从整体考虑，选择适当的温度使得整体的催化效率最高，故选择温度 35 °C 作为反应条件。

2.3 投酶量的确定

分别改变 3 种酶的投酶量，其他条件参考 1.3.3，分别得出 3 种酶投酶量与反应速度的关系，如图 3 所示。

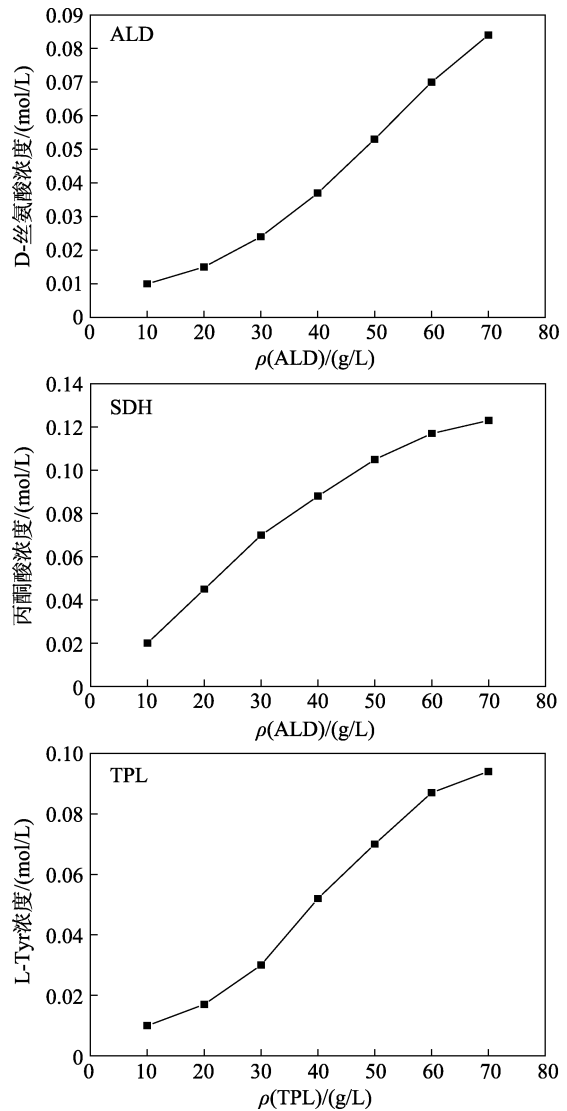


图 3 酶浓度对比对反应速度的影响

Fig. 3 Effect of enzyme concentration on the reaction rate

由图 3 可知，当 1 h 生成 D-丝氨酸 0.07 mol/L 时，SDH 正好将生成的 D-丝氨酸转化为 0.07 mol/L 的丙酮酸，同时 TPL 正好将生成的丙酮酸转化成 0.07 mol/L 的 L-Tyr，如此反应 12 h，L-Tyr 质量浓度可达 66.3 mol/L，总投酶量比较经济，在工业生产上可获得一定利润，且有较好的可行性，符合工业生产要求。此时 3 种酶的质量浓度分别为 ALD 60 g/L、SDH 30 g/L、TPL 50 g/L。故选择 3 种酶的细胞质量配比为 ALD 60 g/L、SDH 30 g/L、TPL 50 g/L。

2.4 乙酸铵对 L-Tyr 产量的影响

改变乙酸铵的浓度，其他条件参考 1.3.4，考察不同乙酸铵浓度对 L-Tyr 产量的影响，结果如图 4 所示。

由图 4 可知，随着乙酸铵浓度的增加 L-Tyr 的产量也在增加，当乙酸铵质量浓度到达 6 g/L 后 L-Tyr 的产量维持不变。因为乙酸铵有助于该反应朝正反应方向进行，不同乙酸铵浓度下 L-Tyr 的产量

不同, 当乙酸铵质量浓度达到 6 g/L 时该促进作用达到上限, 再增加乙酸铵浓度 L-Tyr 产量不会进一步提高, 故选择乙酸铵质量浓度 6 g/L。

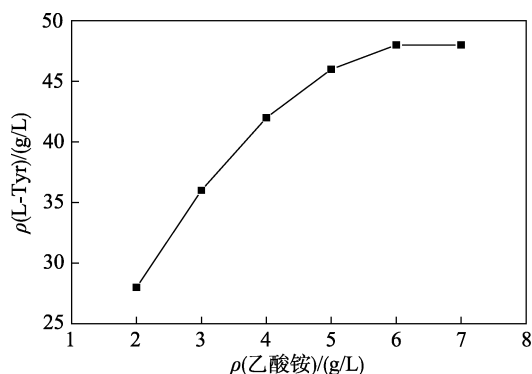


图4 乙酸铵浓度对 L-Tyr 产量的影响

Fig. 4 Effect of ammonium acetate concentration on the yield of L-Tyr

2.5 PLP 浓度对 L-Tyr 产量的影响

改变 PLP 的浓度, 其他条件参考 1.3.5, 考察不同 PLP 浓度对 L-Tyr 产量的影响, 结果如图 5 所示。

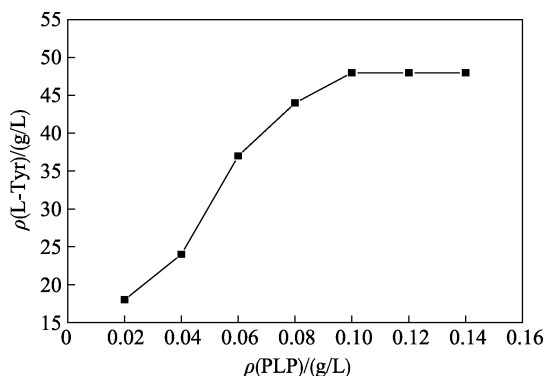


图5 PLP 浓度对 L-Tyr 产量的影响

Fig. 5 Effect of PLP concentration on the yield of L-Tyr

由图 5 可知, 随着 PLP 浓度的增加 L-Tyr 的产量也在增加, 当 PLP 质量浓度到达 0.1 g/L 后 L-Tyr 的产量达到最高, 再增加 PLP 的浓度 L-Tyr 产量不变。因为 PLP 作为 ALD 和 TPL 的辅酶, 在反应中起传递电子的作用, 增加 PLP 浓度可加快反应进程, 当 PLP 质量浓度达到 0.1 g/L 时该促进作用达到上限, 再增加 PLP 浓度 L-Tyr 产量不会进一步提高, 故选择 PLP 质量浓度 0.1 g/L。

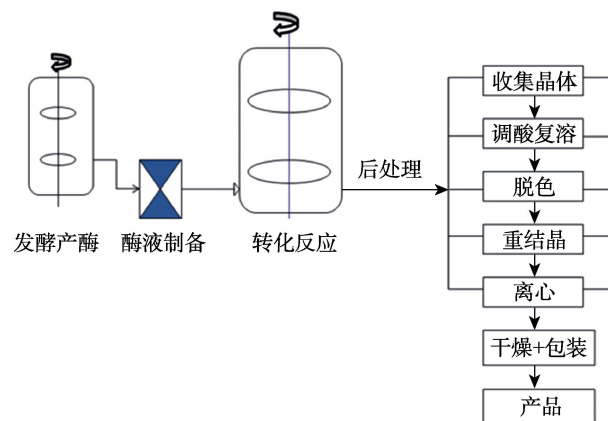
2.6 多酶偶联生物合成 L-酪氨酸的工艺

经过对三酶体系最适反应条件的优化, 得到三酶偶联反应体系最佳反应条件为: 向 500 mL 含有 50 g/L 甘氨酸的溶液中, 加入 6 g/L 乙酸铵、0.1 g/L PLP, 60 g/L ALD、30 g/L SDH、50 g/L TPL, 调节 pH=8.5, 温度 35 °C, 以甲醛引导开始反应, 以 0.1 g/min 的速度流加苯酚, 直至投入苯酚总质量浓

度达到 63 g/L 后停止, 继续反应 30 min 后结束, 反应 11 h, L-Tyr 质量浓度达 113 g/L, 苯酚的转化率为 93%。

2.7 10000 L 转化体系工艺放大验证

L-Tyr 转化工艺流程图如下所示。



10000 L 的转化体系中, 加入 500 kg 甘氨酸、60 kg 乙酸铵、1 kg PLP, 控制 pH=8.5, 温度为 35 °C, 加入 60 g/L ALD、30 g/L SDH、50 g/L TPL, 以甲醛引导开始反应, 以 0.1 g/(L·min) 的速度流加苯酚, 直至投入苯酚总质量浓度达到 63 g/L 后停止, 继续反应 30 min 后结束, 反应 11 h, L-Tyr 质量浓度可达 117 g/L, 苯酚转化率达到 97%。转化体系放大后苯酚转化率提高了 4%。该转化液先经板框压滤机分离出 L-Tyr 粗品, 再在搅拌下将该粗品用稀硫酸完全溶解, 质量浓度约为 100 g/L; 按照 100 g 溶液加入 1 g 活性炭的比例向该溶液中加入活性炭, 50 °C 脱色 30 min; 向脱色完毕后的溶液中加入助滤剂硅藻土, 通过板框压滤机得到 L-Tyr 清液; 用 300 g/L 的 NaOH 溶液将该清液缓慢调节 pH=5.0, pH 上升过程中会有大量 L-Tyr 晶体析出; 将温度冷却至 10 °C 后离心收集晶体, 用纯化水清洗两遍后放入烘箱中 45 °C 烘 12 h 得 L-Tyr 成品 995 kg, 收率为 85%, 纯度为 99.94%, 比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = -11.5^\circ$ ($c = 5.1$ mol/L 盐酸), 与肖国安^[16]等报道的比旋光度一致。

3 结论

甘氨酸和甲醛通过 ALD 的作用可以合成 D-丝氨酸, SDH 可将 D-丝氨酸转化为丙酮酸铵, 丙酮酸铵和苯酚在 TPL 的作用下可以合成 L-Tyr, 本文直接将 3 种酶偶联作用, 在中间体丙酮酸铵不经任何方法提取分离的情况下, 加入苯酚直接转化成稳定的 L-Tyr。实验对这一偶联反应的转化条件进行了探索。其最佳转化条件为: pH=8.5, 温度为 35 °C, 6 g/L 乙酸铵、0.1 g/L PLP, 3 种酶细胞配比 $m(\text{ALD}) : m(\text{SDH}) : m(\text{TPL}) = 6 : 3 : 5$ 。利用该工艺进行

10000 L 放大验证, 反应 11 h, 产物质量浓度可达 117 g/L, 苯酚转化率为 97%, 转化体系放大后苯酚转化率提高 4%, L-Tyr 成品收率为 85%。本研究将廉价的甘氨酸通过酶的作用转化成中间体 D-丝氨酸和丙酮酸氨, 再加入苯酚合成附加值较高的 L-Tyr, 省去了 D-丝氨酸和丙酮酸氨的提纯工艺。如今, 丙酮酸的制备方法主要是酒石酸的脱水脱羧法, 该方法污染大、产酸率低、成本高。本文提供了一种较环保的丙酮酸来源, 以及 L-Tyr 的合成方法, 对资源合理利用及绿色合成工艺具有参考意义。接下来的研究重点是通过基因手段提高 3 种酶的酶活, 从而降低投酶量, 提高底物的转化率, 进一步降低 L-Tyr 的生产成本。

参考文献:

- [1] Chang Junjun (常俊俊), Liu Junzhong (刘均忠), Liu Xi (刘茜), *et al.* Synthesis of L-tyrosine by whole cell with recombinant tyrosine phenol lyase[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2013, 30(10): 1112-1116.
- [2] Feng yingying (冯莹莹), Liu Junzhong (刘均忠), Zhang Hongjuan (张宏娟), *et al.* Biosynthesis of L-tyrosine with whole cell coupled aspartate aminotransferase and tyrosine phenol-lyase[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2014, 31(5): 570-574, 606.
- [3] Wei Pinghe (韦平和), Peng Jiaping (彭加平), Ying Jia (营佳), *et al.* Tyrosine phenol-lyase and its application in enzymatic synthesis of L-tyrosine[J]. *Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics (中国生化药物杂志)*, 2012, 33(5): 695-697.
- [4] Liu Xun (刘勋), Hu Min (胡敏), Luo Hechun (罗合春), *et al.* Technology progress on separating amino acids[J]. *Amino Acids and Biotic Resources (氨基酸和生物资源)*, 2008, 30(1): 41-43.
- [5] Chávez-Béjar M I, Báez-Viveros J L, Martíne A, *et al.* Biotechnological production of L-tyrosine and derived compounds[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(7): 1017.
- [6] Juminaga D, Baidoo E E K, Reddingjohanson A M, *et al.* Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(1): 89-98.
- [7] Wu Min (吴敏), Wei Ping (韦萍), Zhou Hua (周华), *et al.* Study on synthesis of L-tyrosine by microbial conversion[J]. *Chemical World (化学世界)*, 2002, 43(9): 476-478.
- [8] Patnaik R, Zolandz R R, Green D A, *et al.* L-tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: Fermentation optimization and recovery[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2010, 99(4): 741-752.
- [9] Chang Junjun (常俊俊). Study on enzymatic synthesis of L-tyrosine[D]. Nanjing: Nanjing University (南京大学), 2014.
- [10] Chandel M, Azmi W. Optimization of process parameters for the production of tyrosine phenol lyase by *Citrobacter freundii* MTCC 2424[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(5): 1840-1846.
- [11] Gao Han (高晗). Biosynthesis of pyruvate and L-tyrosine by multi-enzyme coupled reaction system[D]. Nanjing: Nanjing University (南京大学), 2014.
- [12] Koulikova V V, Zakomirdina L N, Gogoleva O I, *et al.* Stereospecificity of isotopic exchange of C-13- α -protons of glycine catalyzed by three PLP-dependent lyases: The unusual case of tyrosine phenol-lyase[J]. *Amino Acids*, 2011, 41(5): 1247-1256.
- [13] Gu Jinsong (谷劲松), Qu Yinbo (曲音波). Study on enzymatic synthesis of pyruvic acid with lactate oxidase[J]. *Microbiology (微生物学通报)*, 2003, 30(1): 86-90.
- [14] Yu Ronghua (于荣华), Tan Jiaoying (谭娇颖), Qiao Hao (乔浩), *et al.* Chemo-enzymatic synthesis of D-serine[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2013, 30(5): 510-512.
- [15] Liang Qianling (梁倩玲), Liu Lifang (刘丽芳). Determination of calcium pyruvate by HPLC[J]. *Guangzhou Chemistry (广州化学)*, 2002, 27(1): 29-31.
- [16] Xiao Guoan (肖国安), Wang Xianbing (王先兵), Jiao Qingcai (焦庆才), *et al.* Enzymatic conversion of L-tyrosine preparation: CN103224972A[P]. 2015-02-04.
- [11] Wybenga G, Szymanski W, Wu B, *et al.* Structural investigations into the stereochemistry and activity of a phenylalanine-2, 3-aminomutase from *Taxus chinensis*[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(19): 3187-3198.
- [12] Wu B, Szymanski W, Wybenga G G, *et al.* Mechanism-inspired engineering of phenylalanine aminomutase for enhanced beta-regioselective asymmetric amination of cinnamates[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2012, 51(2): 482-486.
- [13] Chesters C, Wilding M, Goodall M, *et al.* Thermal bifunctionality of bacterial phenylalanine aminomutase and ammonia lyase enzymes[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2012, 51(18): 4344-4348.
- [14] Zhu Longbao (朱龙宝), Tao Yugui (陶玉贵), Ge Fei (葛飞), *et al.* Production and characterization of phenylalanine aminomutase from *Streptomyces Maritimus* and synthesis of beta-arylalanine[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese (高等学校化学学报)*, 2017, 38(2): 206-211.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(9): 248-254
- [16] Heberling M M, Masman M F, Bartsch S, *et al.* Ironing out their differences: dissecting the structural determinants of a phenylalanine aminomutase and ammonia lyase[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(4): 989-997.
- [17] Wu B, Szymanski W, Wietzes P, *et al.* Enzymatic synthesis of enantiopure alpha- and beta-amino acids by phenylalanine aminomutase-catalysed amination of cinnamic acid derivatives[J]. *Chembiochem*, 2009, 10(2): 338-344.
- [18] Walker K D, Klettke K, Akiyama T, *et al.* Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis[J]. *Journal Biological Chemistry*, 2004, 279(52): 53947-53954.

(上接第 454 页)

- [2] Magarvey N A, Fortin P D, Thomas P M, *et al.* Gatekeeping versus promiscuity in the early stages of the andrimid biosynthetic assembly line[J]. *ACS Chemical Biology*, 2008, 3(9): 542-554.
- [3] Kudo F, Miyagana A, Eguchi T. Biosynthesis of natural products containing beta-amino acids[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(8): 1056-1073.
- [4] Ratnayake N D, Theisen C, Walter T, *et al.* Whole-cell biocatalytic production of variously substituted beta-aryl- and beta-heteroaryl-beta-amino acids[J]. *Journal Biotechnology*, 2016, 217: 12-21.
- [5] Grayson J I, Roos J, Osswald S. Development of a commercial process for (S)-beta-phenylalanine[J]. *Organic Process Research & Development*, 2011, 15(5): 1201-1206.
- [6] Forro E, Fueleop F. Recent lipase-catalyzed hydrolytic approaches to pharmacologically important beta- and gamma-amino acids[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(36): 6178-6187.
- [7] Grulich M, Brezovsky J, Stepanek V, *et al.* Resolution of alpha/beta-amino acids by enantioselective penicillin G acylase from *Achromobacter sp*[J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2015, 122: 240-247.
- [8] Mathew S, Jeong S S, Chung T, *et al.* Asymmetric synthesis of aromatic beta-amino acids using omega-transaminase: Optimizing the lipase concentration to obtain thermodynamically unstable beta-keto acids[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(1): 185-190.
- [9] Mathew S, Bea H, Nadarajan S P, *et al.* Production of chiral α -amino acids using ω -transaminase from *Burkholderia graminis*[J]. *Journal Biotechnology*, 2015, 20(196/197): 1-8.
- [10] Parmeggiani F, Weise N J, Ahmed S T, *et al.* Synthetic and therapeutic applications of ammonia-lyases and aminomutases[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 73-118.