

β -丙氨酸的生物代谢过程及生物法制备研究进展

丁 乾, 段绪果*

(南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037)

摘要: β -丙氨酸是自然界中唯一一种天然存在的 β 型氨基酸, 也是一种非蛋白氨基酸。 β -丙氨酸在食品、医药、化工和饲料等领域具有重要用途, 市场前景非常广阔。目前, β -丙氨酸的合成方法有化学法和生物法。相较于化学法复杂的生产流程, 生物法具有产物专一、条件温和及工艺简单等优点, 是公认的更环保、更有前景的 β -丙氨酸生产方法。该文综述了 β -丙氨酸的性质、应用、生物代谢路径及主要的生物合成法, 重点讨论了生物法生产 β -丙氨酸的现状及存在的问题。以期对 β -丙氨酸的高效、绿色生产工艺开发及工业化应用提供参考。

关键词: β -丙氨酸; 生物法; 发酵法; 酶转化; L-天冬氨酸- α -脱羧酶

中图分类号: TQ922.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 04-0741-13

Research progress on bio-metabolic pathways and biopreparation of β -alanine

DING Qian, DUAN Xuguo*

(College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: β -Alanine, a non-protein amino acid, is the only naturally existing β -type amino acid in nature, which has important applications in the food industry, pharmaceutical industry, chemical industry, feed industry, and other fields, and broad market potential. At present, chemical synthesis and biosynthesis are the two methods for β -alanine synthesis. In comparison to the chemical method with complex production process, the biological method, showing the advantages of product specificity, mild conditions, and simple process, is recognized as a more environmental-friendly and promising β -alanine production method. Herein, the properties, applications, biological metabolic processes and main biological preparation methods of β -alanine were reviewed, with emphasis on the current situation and existing problems of biological production method. This review is expected to provide reference for the development of efficient and green production process and industrial application of β -alanine in the future.

Key words: β -alanine; biological method; fermentation; enzymatic transformation; L-aspartate- α -decarboxylase

β -丙氨酸 (β -Alanine) 又名 3-氨基丙酸, 是生产食品添加剂、药品和含氮化学品等的重要前体或中间体, 可广泛应用于食品、饲料、化工及医药等领域 (如图 1 所示)。在食品行业中, 由于 β -丙氨酸是生物体内合成肌肽的前体物质, 可作为一种营养补充剂, 显著提高生物体内的肌肽含量, 进而提高身体的运动能力^[1-2]; 在畜牧业中, 饲料中添加 β -丙氨酸可调控肌肉生长, 提高肌肉的抗氧化能力, 进而改善肉制品品质^[3]。

目前, 工业上可采用化学法与生物法来生产 β -

丙氨酸。化学法效率高、周期短、成本低; 但反应条件比较极端, 需要在高温高压、强酸强碱等条件下进行, 且副产物较多、能耗大。生物法包括发酵法和酶法, 该法成本低廉、反应温和、安全绿色, 是当前主要的研究方向。其中, 发酵法生产 β -丙氨酸虽然底物来源丰富、操作简便, 但是微生物代谢路径复杂、副产物较多、产物不易分离纯化。目前, 研究者主要是通过对 β -丙氨酸的合成途径进行系统性的改造, 迫使宿主细胞代谢高效地流向 β -丙氨酸的合成, 进而改变发酵法副产物较多、转化效率低

收稿日期: 2022-07-18; 定用日期: 2022-10-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220673

基金项目: 江苏省高校优秀中青年骨干教师和校长境外研修计划项目; 南京林业大学青年拔尖人才项目 (GXL2018010)

作者简介: 丁 乾 (1998—), 男, 硕士生, E-mail: 1162146381@qq.com。联系人: 段绪果 (1981—), 男, 博士, 副教授, E-mail: xgduan@njfu.edu.cn。

等问题^[4]。其次，酶法生产 β -丙氨酸的底物专一性强、工艺简单、产物易分离纯化且绿色环保。但是，该法存在酶活较低、易发生机理性失活及底物抑制等问题。针对上述问题，研究者主要采取密码子优化^[5]、异源表达^[6]等方式提高相关酶的表达量，利用定点突变^[7]等方式提高酶的催化稳定性及催化效率，同时采取多酶级联反应^[8-9]等方式，利用低成本原料，提高 β -丙氨酸的产量及产率。

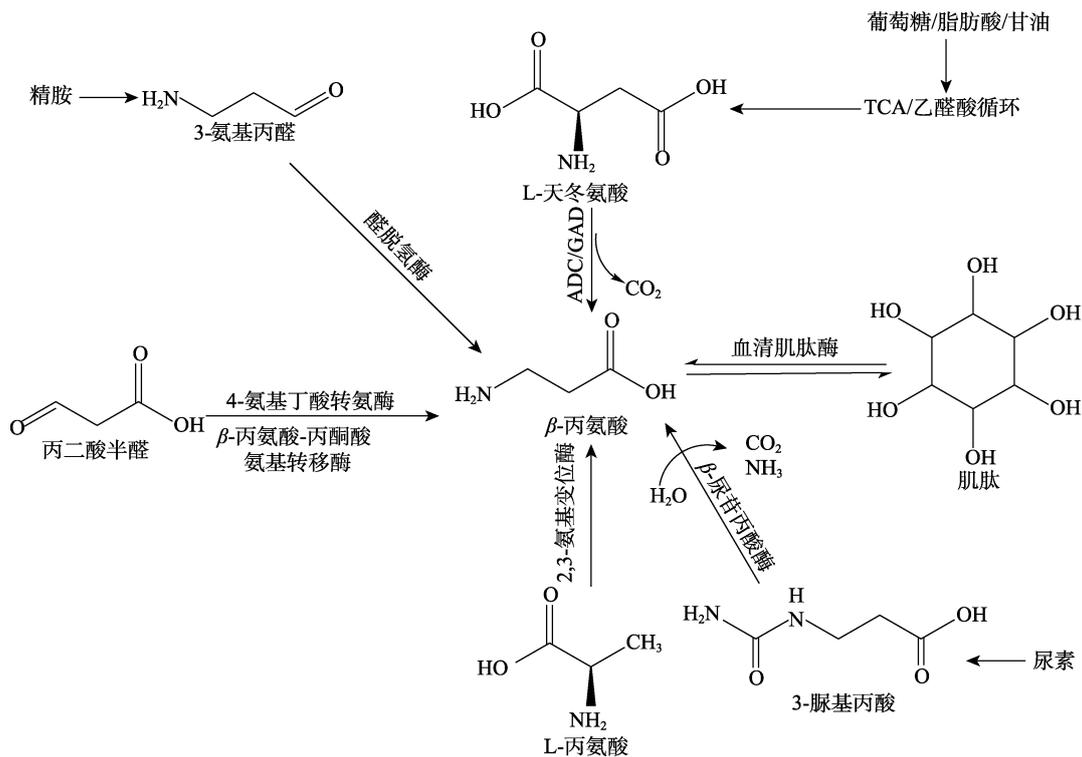


图 1 β -丙氨酸的化学结构式及其应用
Fig. 1 Chemical structure and application of β -alanine

随着“绿色、环保、生态”的可持续发展理念成为普遍共识，利用生物法制备 β -丙氨酸已逐渐成为发展趋势。本文综述了 β -丙氨酸的生物代谢路径及目前主要的生物制备方法，详细叙述了当前研究者针对发酵途径、催化用酶及转化条件等方面的改进策略，并对未来 β -丙氨酸的酶法制备进行了展望，以期今后的相关研究提供参考。

1 β -丙氨酸的生物代谢路径

β -丙氨酸几乎存在于所有生物体内，是生物体中合成泛酸盐的关键成分之一，后者是合成辅酶 A (CoA) 不可缺少的维生素前体。辅酶 A 参与生物体中 100 多种代谢反应，在生命活动中发挥重要作用^[10]。此外， β -丙氨酸在真核生物的免疫和中枢神经系统的调节中也发挥重要作用。根据物种的不同， β -丙氨酸在生物体内的代谢途径具有很大差别，可由葡萄糖、脂肪酸、甘油、L-天冬氨酸、肌肽、L-丙氨酸、丙二酸半醛、精胺等物质代谢生成。 β -丙氨酸的不同生物代谢途径示意图如图 2 所示。



GAD 为谷氨酸脱羧酶；ADC 为 L-天冬氨酸- α -脱羧酶；TCA 为三羧酸循环，下同

图 2 β -丙氨酸生物代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathway of β -alanine

如图 2 所示，当以葡萄糖或脂肪酸为底物时，菌体可将摄入的葡萄糖或脂肪酸通过三羧酸循环转化为 L-天冬氨酸^[11]，之后即可一步生成 β -丙氨酸。当以微生物发酵法制备 β -丙氨酸时，为了提高 β -丙氨酸的产量与产率，常对此代谢途径进行改造，敲

除无关代谢途径，迫使代谢更多地流向 β -丙氨酸的合成路径^[12]。除以葡萄糖为底物外，当以丙酮酸或甘油为底物时，可借助草酰乙酸等中间代谢产物，最终通过三羧酸循环或乙醛酸循环途径生成 β -丙氨酸^[13]。乙酰 CoA、尿嘧啶等物质^[10,14]也可在生物体

内通过多步代谢途径降解为 β -丙氨酸。

除上述途径外, 古细菌中的谷氨酸脱羧酶可以 L-天冬氨酸为底物生成 β -丙氨酸^[15]。当人体摄入肌肽时, 可在血清肌肽酶的作用下, 将肌肽转化为 β -丙氨酸^[16]。细菌等以 L-丙氨酸为底物^[10], 可在 2,3-氨基变位酶的催化作用下进一步生成 β -丙氨酸^[17]。酿酒酵母可以精胺为底物^[10]通过降解精胺生成 β -丙氨酸。动物以丙二酸半醛为底物, 可在 4-氨基丁酸

转氨酶的作用下生成 β -丙氨酸^[10,18], 植物则需在 β -丙氨酸-丙酮酸氨基转移酶^[19]的催化作用下才可将丙二酸半醛转化为 β -丙氨酸。

可见, β -丙氨酸在生物体内具有非常多样的代谢合成途径, 这为生物法合成 β -丙氨酸提供了丰富多样的选择路径。依据生产方式的不同, 生物法制备 β -丙氨酸可分为发酵法与酶法两大类, 不同 β -丙氨酸生物制备方法的优劣势对比如表 1 所示。

表 1 β -丙氨酸不同生物制备方法的优劣势

Table 1 Advantages and disadvantages of different biological preparation methods of β -alanine

方法	优势	劣势
发酵法	(1) 底物种类丰富, 更符合“绿色发展”理念; (2) 底物成本低廉; (3) 工程菌代谢路径丰富, 开发潜力较大	(1) 高浓度的 β -丙氨酸对工程菌的生长有明显的抑制作用; (2) 生物代谢具有复杂性、改造工程量大、操作复杂、效益低; (3) 易产生副产物积累现象(醋酸盐等)、分离纯化困难; (4) 代谢通路较多, 难以确定改造的主要瓶颈; (5) 会产生缺陷型菌株, 需对培养基进行补充优化; (6) 转化效率较低, 易发生碳损失
酶法	(1) 反应路径简单、副产物极少; (2) 产量高、转化效率高; (3) 可与某些化学方法相串联, 具有灵活性	(1) 底物价格昂贵, 某些底物难以获得; (2) 用酶量较大、成本较高; (3) 易产生不可逆失活, 失活机理没有明确阐述

2 发酵法合成 β -丙氨酸

发酵法主要是通过基因工程手段改变宿主细胞 β -丙氨酸代谢的相关基因, 对 β -丙氨酸的合成途径进行系统性的改造, 迫使宿主细胞在生产代谢时改变原有的正常代谢途径, 使得代谢高效地流向 β -丙氨酸合成方向; 最后, 对发酵条件进行系统性的优化, 大幅度提高 β -丙氨酸的合成水平。微生物细胞中 β -丙氨酸合成相关的代谢途径如图 3 所示。

目前, 在微生物内发现的涉及 β -丙氨酸发酵生产的途径主要有 3 条, 分别是 TCA 循环(三羧酸循环)的氧化分支途径、乙醛酸循环途径与 TCA 循环的还原分支途径^[20]。其中, 前两条途径为需氧代谢途径, TCA 循环的还原分支途径为无氧代谢途径。由此, 可将 β -丙氨酸的发酵法制备分为厌氧发酵法与好氧发酵法两大类。厌氧发酵法与好氧发酵法制备 β -丙氨酸的优劣势对比如表 2 所示。

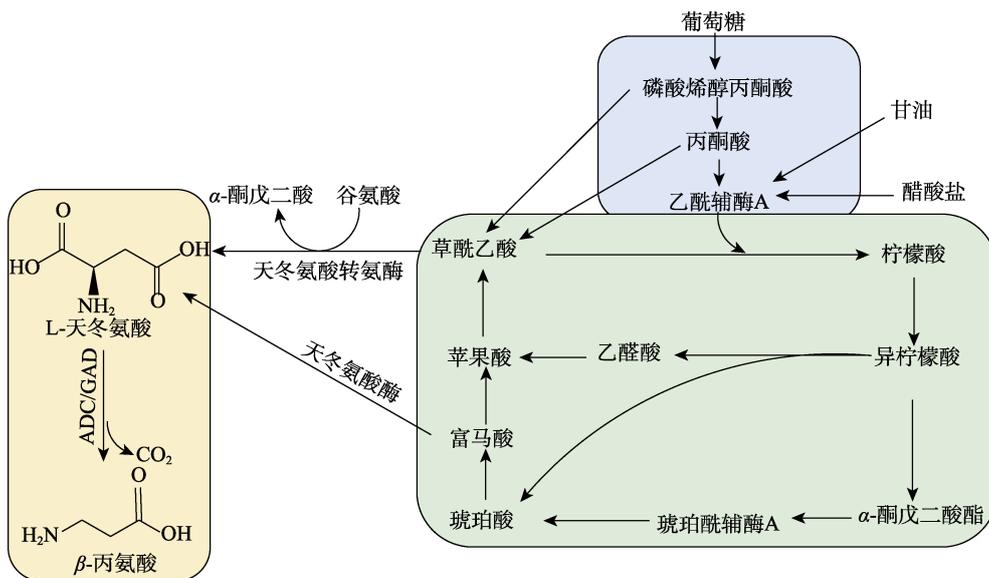


图 3 微生物细胞中 β -丙氨酸合成相关的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathways associated with β -alanine synthesis in microbial cells

表 2 β -丙氨酸不同发酵法制备方法的优劣势Table 2 Advantages and disadvantages of different fermentation preparation methods of β -alanine

方法	涉及途径	优势	劣势
厌氧发酵	TCA 循环的还原分支途径	(1) 代谢路径短, 改造相对简单; (2) 减少 TCA 循环中的碳损失, 具有最高理论产量	(1) 菌体代谢能量供应不足, 生长受阻; (2) 产量较低; (3) 有机酸及其他副产物大量积累, 菌株代谢缓慢
好氧发酵	TCA 循环的氧化分支途径和乙醛酸循环途径	(1) 菌体能量供应充足, 工程菌长势好, 代谢快; (2) 底物来源较为丰富; (3) 菌体代谢较快, 获得产量较高	(1) 代谢路径复杂, 改造工程量大; (2) 易产生不必要损耗; (3) 中间产物较多, 不易确定改造瓶颈

2.1 厌氧发酵法制备 β -丙氨酸

对于厌氧发酵法制备 β -丙氨酸, 菌株将磷酸烯醇丙酮酸转化为草酰乙酸后, 会直接将草酰乙酸转化为 L-天冬氨酸, 最终生成 β -丙氨酸。该过程不涉及三羧酸循环或乙醛酸循环途径, 反应路线较短, 具有理论产量高与减少 TCA 循环中碳损失的优点。同时, 由于该反应过程步骤少, 不仅可避免复杂的调节, 还可减少反应过程中能量的供应。梁珊珊^[21]通过叠加敲除乙酸、甲酸、乙醇等副产物途径及 β -丙氨酸的竞争途径, 使得发酵液中 β -丙氨酸的厌氧发酵产量达到了 0.1 g/L。徐建^[4]通过强化厌氧代谢过程中三磷酸腺苷 (ATP) 及草酰乙酸的供应、构

建 β -丙氨酸合成代谢途径、偶联草酰乙酸合成过程与 ATP 合成过程等方式对大肠杆菌的代谢进行了系统的调控, 仅得到了 95.71 mg/L 的 β -丙氨酸, 随后通过适应性进化策略解决了厌氧发酵能量供应不足的问题, 最终获得了 1.07 g/L 的 β -丙氨酸产量^[22]。PIAO 等^[20]则通过利用辅助因子自给系统驱动 L-天冬氨酸生成、阻断竞争途径、优化生物转化条件等方式促进代谢最大程度地流向 β -丙氨酸, 最终该重组菌的 β -丙氨酸产量可在第 21 h 达到 0.424 mol/L (约为 37.7 g/L)。厌氧发酵法制备 β -丙氨酸方法及产量如表 3 所示。

表 3 厌氧发酵法制备 β -丙氨酸方法及产量Table 3 Preparation method and yield of β -alanine by anaerobic fermentation

Host	Substrate	<i>PanD</i> source	β -Alanine production/(g/L)	References
<i>Escherichia coli</i> B0016	Glycerol	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	0.1	[21]
<i>Escherichia coli</i> B0016	Glycerol	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1.07	[22]
<i>Escherichia coli</i> BW25113	Glucose	<i>Bacillus subtilis</i>	37.7	[20]

注: *Escherichia coli* 为大肠杆菌; *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) 为谷氨酸棒杆菌; *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) 为枯草芽孢杆菌, 下同。

无氧发酵法制备 β -丙氨酸虽然具有可行性, 但通过该方法生产 β -丙氨酸也具有明显的缺点。首先, 该法需要对 TCA 循环中不同的基因靶点进行修改, 工作量较大。同时, TCA 循环不仅是生物体获得能量最高效的方式, 而且是物质代谢的枢纽, 若对该循环进行抑制或改造, 会使得生产菌的菌体浓度过低, 有机酸大量积累, 生产菌株代谢缓慢, 从而严重影响 β -丙氨酸的进一步生产。

2.2 好氧发酵法制备 β -丙氨酸

对于好氧发酵法制备 β -丙氨酸, 菌株的代谢过程改造涉及 TCA 循环与乙醛酸循环, 当通过 TCA 循环或乙醛酸循环代谢生成中间代谢产物富马酸后, 才可进一步转化为 β -丙氨酸。梁珊珊^[21]构建了敲除 β -丙氨酸竞争途径的重组菌株, 强化 L-天冬氨酸向 β -丙氨酸生成的代谢强度, 最终 β -丙氨酸产量达 18.4 g/L。SONG 等^[23]通过增强富马酸向 L-天冬氨酸的代谢及磷酸烯醇丙酮酸向草酰乙酸代谢, 强

化 L-天冬氨酸的脱羧反应, 补充催化反应底物 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等方式, 使得 β -丙氨酸的发酵产量达到 3.94 g/L。当乙酰辅酶 A 合成酶基因原本的启动子替换为 *trc* 强启动子后, 增强了醋酸盐向乙酰辅酶 A 的转化, 醋酸在改造菌株内的积累减少, β -丙氨酸产量可达 32.3 g/L。除此之外, 弱化缬氨酸合成、敲除富马酸消耗途径、强化草酰乙酸供应及修饰葡萄糖摄取等方式构建并系统性地改造大肠杆菌 β -丙氨酸的好氧合成代谢, 可使得 β -丙氨酸的产量进一步的提升至 37.93^[4]、43.12^[15]和 43.94 g/L^[24]。葡萄糖是发酵法制备 β -丙氨酸最常见的底物, 但该底物存在碳损失, 转化效率低等问题。近年来, MIAO 等^[25]利用 *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) 以甲醇为底物进行 β -丙氨酸的生产, 获得了 5.60 g/L 的 β -丙氨酸。MIAO 等^[11]则利用脂肪酸为原料, 通过乙醛酸-TCA 循环途径合成 β -丙氨酸, 最终获得了 72.05 g/L 的 β -丙氨酸, 转化率高达 1.24 g/g, 远超目

前已报道的水平。该法以脂肪酸原料解决了碳损失、细胞生长抑制等问题。好氧发酵法制备 β -丙氨酸方法及产量如表 4 所示。

β -丙氨酸的好氧发酵法制备虽然消除了能量供应不足, 菌体代谢缓慢的缺点, 使得 β -丙氨酸产量相较无氧发酵获得了较大的提升, 但是其不足也显而易见。在微生物的代谢途径中, L-天冬氨酸是 10 多种代谢途径的前体, 涉及蛋白质的合成和其他 L-天冬氨酸家族氨基酸的产生^[26], 且其他代谢中间产物常涉及细胞内的其他生理代谢反应, 所以在好氧发酵生产时常会产生不必要的消耗。同时, 由于微生物代谢流的中间产物极多, 很难确定 β -丙氨酸高效率生产的限制瓶颈是什么, 使得发酵法在 β -丙氨酸工业化生产中的应用较为困难。

表 4 好氧发酵法制备 β -丙氨酸方法及产量

Table 4 Preparation method and yield of β -alanine by aerobic fermentation

Host	Substrate	<i>PanD</i> source	β -Alanine production/(g/L)	References
<i>E. coli</i> B0016	Glycerol	<i>C. glutamicum</i>	18.40	[21]
<i>E. coli</i> W3110	Glucose	<i>C. glutamicum</i>	32.30	[23]
<i>E. coli</i> B0016	Glycerol	<i>Tribolium castaneum</i>	37.93	[4]
<i>E. coli</i> W3110	Glucose	<i>Bacillus tequilensis</i>	43.12	[15]
<i>E. coli</i> W3110	Glucose	<i>B. subtilis</i>	43.94	[24]
<i>Pichia pastoris</i>	Methanol	<i>B. subtilis</i>	5.60	[25]
<i>E. coli</i> DH5 α	Fatty acid	<i>Tribolium castaneum</i>	72.05	[11]

注; *Tribolium castaneum* (*T. castaneum*) 为赤拟谷盗; *B. tequilensis* (*Bacillus tequilensis*) 为特基拉芽孢杆菌。下同。

2.3 发酵法制备 β -丙氨酸的调控机理

无论是厌氧发酵法还是好氧发酵法制备 β -丙氨酸, 都需要经过或部分经过 TCA 循环, 将循环中的草酰乙酸或富马酸转换为 L-天冬氨酸后, 才可生成最终的 β -丙氨酸。在工程菌株的实际发酵转化过程中, 中间代谢产物不可避免地会流向一些无关紧要的代谢途径, 产生不必要的碳损失。此时, 需要在不影响细胞正常生长与代谢的条件下对工程菌的副产物代谢途径进行削弱敲除, 对 β -丙氨酸生产的主要代谢途径进行改造加强, 从而使得工程菌的代谢能最大限度地流向 β -丙氨酸生成方向。除此以外, 由于高浓度的 β -丙氨酸会对工程菌株的正常生长产生极度不利的影响, 因此, 菌株的产物耐受性也是研究人员应该考虑的改造方向。 β -丙氨酸生物代谢途径调控如图 4 所示。

目前, 发酵法制备 β -丙氨酸的底物来源有葡萄糖、甲醇、甘油、棕榈酸等。对于葡萄糖的摄取改造, 通常是对工程菌 *ptsG* 蛋白(葡萄糖转运蛋白 IICB) 编码基因进行剔除, 因为 *ptsG* 蛋白编码基因的缺失可使乳酸、醋酸盐等副产物的产量减少, 有助于扩大细胞内 PEP(磷酸烯醇丙酮酸) 的含量, 进而提高 β -丙氨酸的产量。为了恢复葡萄糖的摄入能力, 可通过使用强启动子增强 *glk* 基因(葡萄糖激酶基因) 的表达^[20,24]。对于甲醇、甘油及棕榈酸等底物的摄取, 目前还未有相关改造报道。

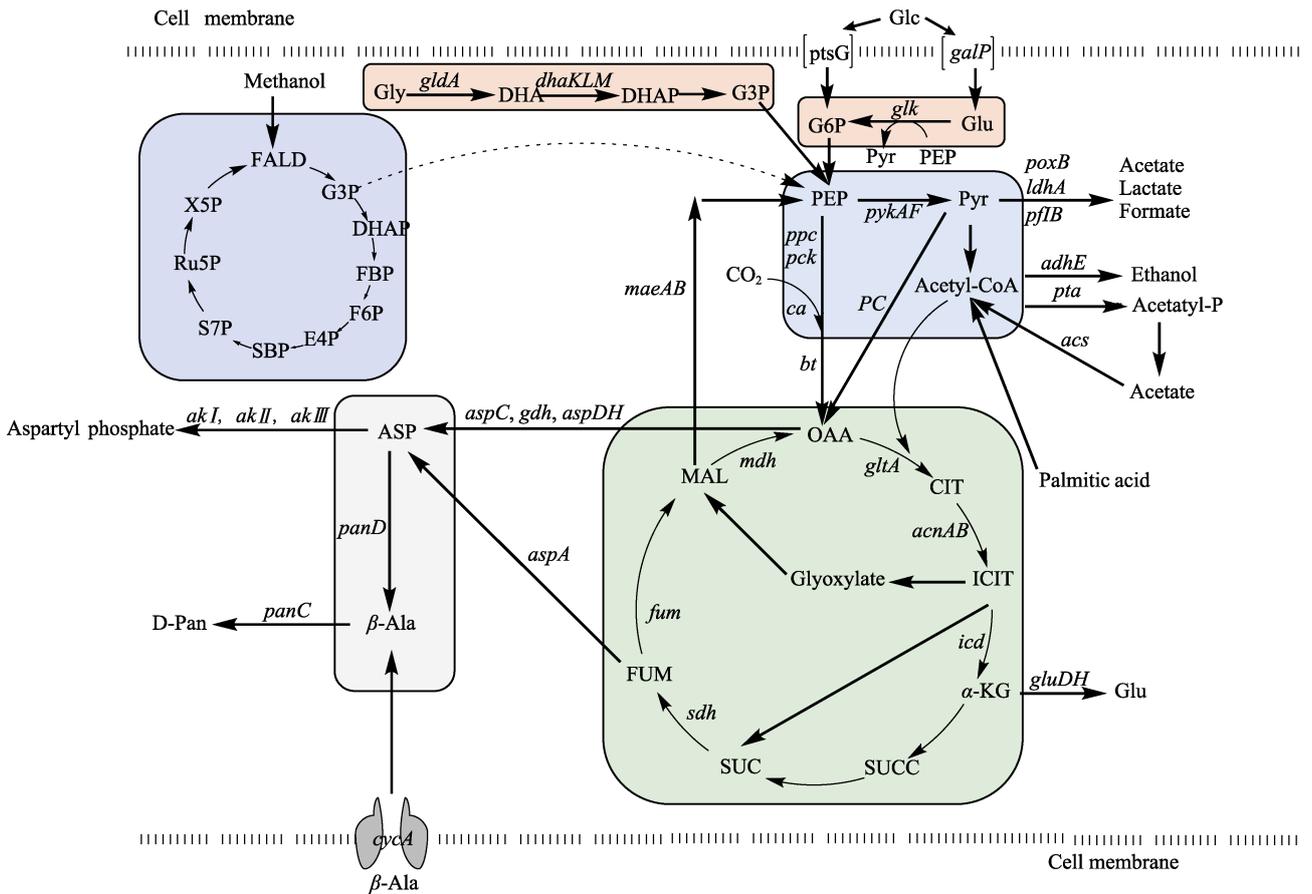
在工程菌株摄取底物后, 经过一系列代谢, 最终会以 PEP 或乙酰辅酶 A 的形式来参与体内的三羧酸循环等代谢途径。目前, 通常将 *ppc* 基因(磷酸烯醇丙酮酸羧化酶基因) 过表达, 并使用合成启动子和 RBS 序列对 *ppc* 基因进行优化, 从而将 PEP 高效地转化为草酰乙酸, 从而显著增加 β -丙氨酸的产量^[15-23]。除了增强磷酸烯醇丙酮酸到草酰乙酸的代谢转化, 删除或提高相关代谢途径也是提高草酰乙酸含量的常用方法。在工程菌的发酵转化过程中, 乳酸脱氢酶(由 *ldhA* 编码) 可催化丙酮酸生成乳酸, *pf1B* (丙酮酸甲酸裂解酶基因) 则会造成碳损失, 而 *pta* (磷酸乙酰转移酶基因) 和 *adhE* (乙醇脱氢酶基因) 则会促进醋酸盐和乙醇的生成。引入 *CgPC* (一种来自谷氨酸棒杆菌的丙酮酸脱羧酶) 和删除大肠杆菌中的 *ldhA*、*pf1B*、*pta* 和 *adhE* 可一步增加草酰乙酸的生物合成^[15]。在该反应过程中, 乙酸或乙酸盐会作为主要的副产品进行积累, 可将 *acs* (乙酰辅酶 A 合成酶基因) 的天然启动子替换为 *trc* 强启动子, 可起到减少乙酸的积累的效果^[23]。除此以外, 通过在染色体上过度表达 *pck* (磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因)、*bt* (碳酸氢盐转运蛋白基因)、*ca* (碳酸酐酶基因) 等也可减少醋酸盐的显著积累现象^[20]。

对于 TCA 及乙醛酸循环等代谢的相关改造, 曾有科研人员将 *fum* (富马酸酶基因) 敲除, 导致了工程菌株中积累了大量醋酸盐。猜测完全阻断 *fum* 可能会降低乙醛酸-TCA 循环的效率。但当恢复 *fum* 基因并进一步敲除 *aspC* (天冬氨酸转氨酶基因) 以增加还原性支链 TCA 中间体的供应后, 乙醛酸-TCA 循环和 β -丙氨酸生产效率得到了一定的提高^[11]。在实际生产时, 谷氨酸脱氢酶会催化 α -酮戊二酸形成副产物谷氨酸, 导致碳通量损失, 并与 *PaeAspDH* (来自铜绿假单胞菌的 L-天冬氨酸脱氢酶基因) 竞争氨, 因此, 可敲除 *GluDH* 基因(谷氨酸脱氢酶基因) 以减少副产物谷氨酸的生成, 但会导致 β -丙氨酸产量有所下降, 细胞生长迟缓, 通常进一步在培养基中添加谷氨酸进行营养素的补充^[15]。

β -丙氨酸前体 L-天冬氨酸的合成主要来源于

TCA 循环中的草酰乙酸和富马酸，所以，两种底物的转化效率在 β -丙氨酸的高产量制备中尤为重要。在厌氧法制备 β -丙氨酸时，由于不经过 TCA 循环的代谢路径，所以只能利用草酰乙酸来进行 L-天冬氨酸的合成。使用强启动子、对 *aspA*（天冬氨酸解氨酶基因）进行过度表达，可使得富马酸有效转化为 L-天冬氨酸^[15,23]。目前，将草酰乙酸转化为 L-天冬氨酸有两种途径：天冬氨酸氨基转移酶（*aspC* 编码）

可直接催化草酰乙酸的转氨，同时使用 L-谷氨酸作为氨基供体。另外，天冬氨酸脱氢酶（由 *aspDH* 编码）催化草酰乙酸生成 L-天冬氨酸，可直接使用氨气作为氨基供体^[20]。为了增加天冬氨酸的含量，研究者将天然 *aspC* 基因替换为 *PaeAspDH*， β -丙氨酸的产量相较替换前提高了 31.4%^[15]。在生成 L-天冬氨酸的代谢过程中，尝试采用 *aspA* 与 *aspC* 进行协同作用，但是并未达到理想的效果^[23]。



注：*gldA* 为甘油脱氢酶基因；*dhaKLM* 为二羟丙酮激酶基因；*ppc* 为磷酸烯醇丙酮酸羧化酶基因；*pck* 为磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因；*pykAF* 为丙酮酸激酶基因；*poxB* 为丙酮酸氧化酶基因编码；*pflB* 为丙酮酸甲酸裂解酶基因；*panD* 为天冬氨酸- α -脱羧酶基因；*PC* 为丙酮酸脱羧酶基因；*pta* 为磷酸乙酰转移酶基因；*panC* 为泛酸合成酶基因编码；*aspA* 为天冬氨酸解氨酶基因；*acs* 为乙酰辅酶 A 合成酶基因；*aspC* 为天冬氨酸转氨酶基因；*aspDH* 为天冬氨酸脱氢酶基因；*adhE* 为乙醇脱氢酶基因；*acnAB* 为乌头酸水合酶基因；*bt* 为碳酸氢盐转运蛋白基因；*ca* 为碳酸酐酶基因；*fum* 为富马酸酶基因；*glk* 为葡萄糖激酶基因；*gltA* 为柠檬酸合成酶基因；*gluDH/gdh* 为谷氨酸脱氢酶基因；*galP* 为半乳糖透性酶基因；*icd* 为异柠檬酸脱氢酶基因；*ldhA* 为乳酸脱氢酶基因；*maeAB* 为脱氢酶基因；*mdh* 为苹果酸脱氢酶基因；*sdh* 为琥珀酸脱氢酶基因；*ptsG* 为主要的葡萄糖转运蛋白 II (Glc)；Glc 为葡萄糖；G6P 为葡萄糖-6-磷酸；Glu 亦为葡萄糖；Pyr 为丙酮酸盐；PEP 为磷酸烯醇丙酮酸；Gly 为甘油；DHA 为二羟丙酮；DHAP 为磷酸二羟丙酮；G3P 为 3-磷酸甘油醛；OAA 为草酰乙酸；CIT 为柠檬酸盐；ICIT 为异柠檬酸盐； α -KG 为 α -酮戊二酸；SUCC 为琥珀酰辅酶 A；SUC 为琥珀酸盐；FUM 为延胡索酸盐；MAL 为苹果酸盐；ASP 为 L-天冬氨酸； β -Ala 为 β -丙氨酸；D-Pan 为 D-泛酸盐；*cycA* 为 β -丙氨酸转运蛋白基因；*ak I*、*ak II* 和 *ak III* 为天冬氨酸激酶基因；FALD 为甲醛；G3P 为甘油-3-磷酸；FBP 为果糖-1,6-二磷酸；F6P 为果糖-6-磷酸；E4P 为核酮糖-4-磷酸；SBP 为景天庚酮糖-1,7-二磷酸；S7P 为景天庚酮糖-7-磷酸；Ru5P 为核酮糖-5-磷酸；X5P 为木酮糖-5-磷酸

图 4 β -丙氨酸生物代谢途径调控
Fig. 4 Regulation of β -alanine metabolic pathway

由于 L-天冬氨酸是多种代谢产物的前体, 除了加强 L-天冬氨酸的主要代谢合成, 也可对其部分副产物消耗途径进行适当的敲除。敲除 3 种天冬氨酸激酶同工酶 (ak I、ak II 和 ak III) 编码基因后, 菌株的生长受到了抑制, β -丙氨酸的产量降低。采用在培养基中补充氨基酸 (L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和 L-赖氨酸) 的方法, 可使得菌株的生长恢复正常并提高产量^[15]。如果采取下调而不是敲除 ak I 和 ak III 基因的表达, 既可减少 L-天冬氨酸不必要的消耗, 又不会抑制工程菌的生长^[24]。

引入不同来源的 *panD* 基因, 催化 L-天冬氨酸脱羧生成 β -丙氨酸是工程菌代谢的最后核心步骤。目前, 常见的 *panD* 来源有谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*)^[23]、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)^[20]、赤拟谷盗 (*T. castaneum*) 及特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*)。一般来说, 密码子优化对可溶性蛋白的异源表达有很大的贡献。在异源表达不同来源的 *panD* 基因时, 可对 ADC (L-天冬氨酸- α -脱羧酶) 的启动子进行适当的优化, 以进一步提高 β -丙氨酸的产量^[15]。通过适当增加 *panD* 拷贝数也可进一步提高 β -丙氨酸产量, 但 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的过度表达, 可能给毕赤酵母造成相当大的代谢负担, 从

而降低 β -丙氨酸的产量^[25]。

β -丙氨酸的代谢过程中, 会出现底物积累的现象, 由此可能会抑制工程菌的生长, 研究证明, 当 β -丙氨酸产量达到 80 g/L 时, 会对菌株的生长产生极度不利的影响^[24-25]。 β -丙氨酸转运体 [由 *cycA* 基因编码] 属于氨基酸转运体家族, 可通过使用 CRISPR/Cas9 系统从宿主中删除 *cycA*, 避免工程菌对 β -丙氨酸的摄入, 从而消除 β -丙氨酸对工程菌的生长抑制^[24]。

3 酶法制备 β -丙氨酸

β -丙氨酸的酶法合成是指采用酶制品或利用细胞中酶在体外进行物质转变以获得 β -丙氨酸的方法。酶法转化是目前公认的较为环保、有前景的 β -丙氨酸生产方法。虽然此法存在底物价格较高、酶活较低、底物抑制等问题, 但是酶法相较于发酵法, 副产物更少、纯化更容易、产量更高, 而且酶法转化反应条件温和、特异性强、能耗较低、设备不易损、催化效率高、工艺流程简单易控且绿色无污染, 具有巨大的应用潜力。根据所使用酶的数量或种类, 大致可分为单酶法、双酶级联法及三酶级联法。 β -丙氨酸不同酶法制备方法的优劣势对比如表 5 所示。

表 5 β -丙氨酸不同酶法制备方法的优劣势

Table 5 Advantages and disadvantages of different enzymatic methods for alanine preparation

方法	底物	酶	优势	劣势
单酶法	L-天冬氨酸、 β -氨基丙腈	L-天冬氨酸- α -脱羧酶、腈水解酶	(1) 底物转化效率高; (2) 流程简易; (3) 产物唯一, 易分离纯化	(1) 底物价格昂贵, 生产成本高; (2) 酶不稳定, 易失活
双酶级联法及三酶级联法	富马酸、马来酸	马来酸异构酶、L-天冬氨酸酶、L-天冬氨酸- α -脱羧酶	(1) 底物价格低廉, 生产成本低; (2) 中间代谢产物积累较少, 减缓了 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的失活	(1) 双酶催化效率差异较大, 不易协同; (2) 产物不唯一, 不易分离纯化

3.1 单酶法制备 β -丙氨酸

3.1.1 腈水解酶水解 β -氨基丙腈制备 β -丙氨酸

腈水解酶 (EC 3.5.5.1) 是一种重要的酶催化剂, 它能将腈类化合物中的腈基直接转化为羧基从而制备羧酸^[27], 因此, 可利用腈水解酶催化 β -氨基丙腈水解来制备 β -丙氨酸。在反应过程中, 腈水解酶会首先攻击 β -氨基丙腈上的 C=N 共价键, 形成酶与底物的中间体, 继而加上一分子的水, 并放出一分子的氨, 当加上第二分子水时便生成了酸^[28]。腈水解酶催化 β -氨基丙腈制备 β -丙氨酸的反应式如图 5 所示。

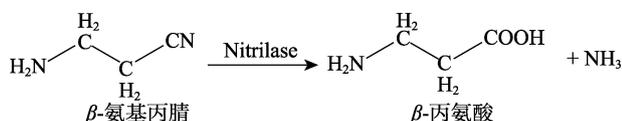


图 5 腈水解酶制备 β -丙氨酸途径

Fig. 5 Preparation of β -alanine by nitrile hydrolase pathway

当底物浓度过高时, 此法会导致反应产物中的 3-氨基酰胺的生成量逐渐增多, 难以对 β -丙氨酸进行分离纯化。梁璐怡等^[29]将 0.7 g 红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) 湿菌体于 10 mL 反应体系中进行 β -氨基丙腈的全细胞催化, 5 h 时可获得 8.91 g/L 的 β -丙氨酸。另一研究表明, 将底物 β -氨基丙腈的质量浓度提高到 210 g/L 时, 在 30 °C、pH 7.0 的条件下, 反应产物中副产物 (3-氨基酰胺) 的含量高达 33%^[30]。以上研究结果表明, 腈水解酶虽然可用于 β -丙氨酸的制备, 但是产量较低, 副产物多且不易分离, 远不符合工业生产的要求。

3.1.2 L-天冬氨酸- α -脱羧酶水解 L-天冬氨酸制备 β -丙氨酸

L-天冬氨酸- α -脱羧酶 (EC 4.1.1.11, ADC) 可催化 L-天冬氨酸脱去 α 位的羧基生成 β -丙氨酸, 反应

路线如图 6 所示。相比脲水解酶, L-天冬氨酸- α -脱羧酶具有更高的 β -丙氨酸产率, 不仅具有极强的底物特异性且产物易分离纯化, 极大地降低了生产成本。

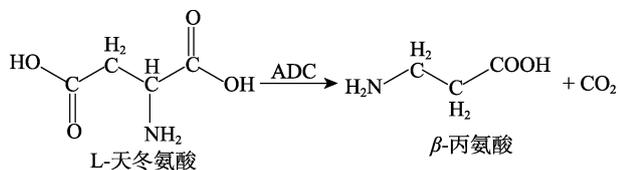


图 6 L-天冬氨酸- α -脱羧酶制备 β -丙氨酸

Fig. 6 Preparation of β -alanine by L-aspartate- α -decarboxylase

目前, 对于 L-天冬氨酸- α -脱羧酶制备 β -丙氨酸的探索主要有: 通过筛选不同来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶编码基因 (*panD*), 通过基因工程等手段构建载体, 将其导入到合适的宿主细胞中进行重组表达; 通过突变改造获得催化效率更高的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶突变体; 优化转化条件来提高酶反应效率等。

L-天冬氨酸- α -脱羧酶的编码基因 *panD* 最早发

现于大肠杆菌中。大肠杆菌来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶在最优培养条件下, 酶活可达 0.19 U/mL; 酶学性质表征结果显示, 其最适温度和 pH 分别为 45 °C、pH=8.0, 金属离子对其酶活几乎无影响^[31]; 在最佳激活条件下孵育 22 h, L-天冬氨酸的转化率约为 12 mol/(L·g)^[32]。早期 *panD* 的异源表达多来源于大肠杆菌, 但该来源的 *panD* 存在酶活低、产量低、热稳定性差等缺点, 不适用于大规模的工业生产, 需对不同菌种来源的 *panD* 进行更深入的研究。此后, 更多的 *panD* 基因被鉴定并克隆表达, 不同生物来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶及性质如表 6 所示。来源主要有微生物 *C. glutamicum*^[33]、*B. subtilis*^[6]、*Corynebacterium crenatum* (钝齿棒杆菌)^[34]、*Corynebacterium jeikeium* (杰氏棒杆菌)^[35-36]、*Listeria monocytogenes* (单核细胞增生李斯特菌)^[35]、*Lactobacillus plantarum* (植物乳杆菌)^[7] 及 *B. tequilensis*^[37]、*Clostridium botulium* (肉毒梭状芽胞杆菌)^[36]等, 以及动物 *T. castaneum*^[38]等。

表 6 不同生物来源的野生型 L-天冬氨酸- α -脱羧酶及性质

Table 6 Wild-type L-aspartate- α -decarboxylase from different biological sources and its properties

Source	Host	Specific activity/(U/mg)	Optimum temperature/°C	Optimum pH	β -Alanine production/(g/L)	Yield/%	References
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	20.15	45	8.0	—	—	[31]
<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	206.50	55	6.0	65.46	97.8	[33]
<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	2.60	55	7.0	—	—	[39]
<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	103.00	55	7.0	12.85	—	[40]
<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	7.52	65	6.5	1.89	—	[6]
<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	9.60	70	6.5	—	—	[7]
<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	8.40	60	6.5	2.23	—	[6]
<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	15.60	65	7.0	3.90	—	[7]
<i>T. castaneum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	4.83	37	6.5	143.00	80.0	[38]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	5.50	70	6.5	—	—	[7]
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	11.80	60	6.0	7.32	82.2	[35]
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	8.90	60	7.0	6.03	67.7	[35]
<i>B. tequilensis</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	—	60	7.5	123.30	99.0	[37]
<i>Clostridium botulium</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	—	—	—	3.62	48.7	[36]
<i>Corynebacterium crenatum</i>	<i>Corynebacterium crenatum</i>	—	—	—	0.08	—	[34]

注: “—” 表示未有相关报道。

将谷氨酸棒杆菌来源的 *panD* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行异源表达和酶学性质表征, 结果显示, 该来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶比酶活远远高于大肠杆菌, 最适温度和 pH 分别为 55 °C 和 7.0, 80 °C 下, 该重组酶的半衰期约为 40 min^[39]。SHEN 等^[40]通过 50 mL 摇瓶水平的补料分批发酵, 使得在 β -丙氨酸产量在 36 h 时达到 12.85 g/L。赵连真^[33]通过单因素实验优化了重组菌的诱导条件, 在最佳条件下

10 L 发酵罐水平的酶活达到了 684.85 U/mL, 并通过分批补料方式得到了 65.46 g/L 的 β -丙氨酸。虽然异源表达谷氨酸棒杆菌来源的 *panD* 基因使得 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的比酶活获得了较大的提高, 但是 β -丙氨酸的实际产量并未得到较大提高, 且存在加酶量较大、酶活下降、底物抑制等难以解决的问题, 仍需要对该酶进一步深入研究。

此外, 将 *L. plantarum*、*E. coli*、*C. glutamicum*

及 *B. subtilis* 来源的 *panD* 基因分别在 *E. coli* BL21 (DE3) 中异源表达, 人们发现来自 *B. subtilis panD* 基因编码的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶有更高的活性。经过酶学性质表征, 该重组酶最适温度和最适 pH 分别为 65 °C 和 7.0, 最适温度下的比酶活为 15.60 U/mg; 在 37 °C、300 mL 体系中加入 7.5 mg 重组酶进行 8 h 的底物转化实验, 可得到 2.23 g/L 的 β -丙氨酸^[6-7]。PEI 等^[41]对 *B. subtilis* 来源的 *panD* 基因进行了定向进化, 获得了两个性能提升的突变体 (V68I 和 I88M), 突变体转化底物获得 β -丙氨酸的产量为 4.1 g/L。张腾辉等^[7]通过定点突变, 构建了突变体 E56S, 该酶突变体在 5 L 罐中转化 β -丙氨酸产量达到了 215 g/L。除了突变改造, 研究人员还采取表达宿主更换^[7]、载体质粒更换^[5]、碳源缺失^[42]等方法提高该重组菌 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的转化能力, 但 β -丙氨酸的最高产量均不及 E56S 突变体。

由于微生物 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的活性中心会与底物结合破坏其丙酮酰基团结构, 转化过程中易失活, 成为该酶应用的一个主要瓶颈^[36]。为了解决上述问题, 科研人员又在其他物种方面做了诸多尝试, 探索了一些其他来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶, 不同生物来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶突变体及其性质如表 7 所示。LIU 等^[38]将 *T. castaneum* 来源的 *panD* 基因进行异源表达, 获得了比酶活为 4.83 U/mg 的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶, 利用在 600 nm 波长处吸光度为 200 的重组菌菌液进行 10 mL 体系的分批补料全细胞催化时, 可将 1 mol 的 L-天冬氨酸转化为 143 g/L 的 β -丙氨酸, 转化率达 80%。针对该重组酶, 分别进行 G369A^[38]、K221R^[43-44]的单突变和 R98H 和 K351S^[45]的双突变, 最优突变体的 β -丙氨酸产量为 170.5 g/L。

表 7 不同生物来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶突变体及其性质Table 7 L-aspartate- α -decarboxylase mutants from different biological sources and their properties

Source	Host	Mutations	Specific activity/(U/mg)	Optimum temperature/°C	Optimum pH	Production/(g/L)	Yield/%	References
<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	E56S	—	—	—	215.3	94.10	[7]
<i>T. castaneum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	G369A	4.80	42	6.0	162.0	91.00	[38]
<i>T. castaneum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	K221R	0.35	40	6.5	134.7	94.52	[43]
<i>T. castaneum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	K49R	0.27	42	6.5	—	—	[46]
<i>T. castaneum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	R98H、K351S	7.05	50	7.0	170.5	95.54	[45]
<i>C. jeikeium</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	R3K	17.31	—	—	22.5	67.23	[36]

注: “—”表示未有相关报道。

除上述两种单酶法制备 β -丙氨酸工艺, 古生菌及真核生物中的谷氨酸脱羧酶 (GAD) 也具有与 L-天冬氨酸- α -脱羧酶相类似功能。但该酶需要磷酸吡哆醛 (PLP) 作为辅酶才可催化天冬氨酸、半胱氨酸和半胱亚磺酸发生脱羧反应, 分别生成 β -丙氨酸、牛磺酸和亚牛磺酸^[47]; 且该酶专一性不高, 酶活较低, 致使该酶在 β -丙氨酸工业化制备方面应用性不强。目前, 还没有关于应用古生菌及真核生物中谷氨酸脱羧酶生产 β -丙氨酸方面的报道^[36]。

3.2 双酶级联法制备 β -丙氨酸

L-天冬氨酸- α -脱羧酶催化 L-天冬氨酸脱去羧基生成 β -丙氨酸是一步反应, 流程简易、产物唯一; 但该过程中的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶易发生不可逆的机理性失活, 有时需要添加一定量的磷酸吡哆醛参与催化, 且底物 L-天冬氨酸价格较高, 严重限制了该方法的应用。L-天冬氨酸酶 (AspA) 可催化富马酸生成 L-天冬氨酸, 与 ADC 联合使用时, 可以以富马酸为底物进行 β -丙氨酸的制备。该级联反应避免了中间体的分离纯化, 节约了生产成本, 减少

了废物的生成, 且富马酸的价格远低于 L-天冬氨酸, 因此, 双酶级联法制备 β -丙氨酸具有较大的工业发展潜力, 其制备路线如图 7 所示。

目前, 对双酶级联法制备 β -丙氨酸的探索主要集中于 L-天冬氨酸酶和 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的协同优化, 双酶级联制备 β -丙氨酸的方法及产量如表 8 所示。QIAN 等^[48]通过对大肠杆菌来源的 L-天冬氨酸酶和谷氨酸棒杆菌来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶液进行不同比例调配, 得到了 AspA 和 ADC 的最佳酶活力比为 (1.0~1.5): 1; 高宇等^[49]发现, AspA 和 ADC 的最优全细胞质量比为 1: 80, 可在 8 h 内将 0.1 mol/L 的富马酸转化为 8.02 g/L 的 β -丙氨酸。为了进一步简化级联反应, 研究人员又将两种异源酶基因在 *E. coli* BL21(DE3) 内进行了共表达。QIAN 等^[48]利用核糖体结合位点调控与基因复制解决了两种酶催化效率差异大、不易协同的问题, 使得 β -丙氨酸的产量达到了 80.4 g/L。随后, 将突变体 Q5 (*BsPanD*^{[46V/I88M/K104S/I126*}) 与 AspA 基因于 *E. coli* BL21(DE3) 中共表达, 最终获得了 118.6 g/L 的 β -

丙氨酸产量^[42]。陈明亮等^[8]采用共表达的方法，最终 β -丙氨酸的产量达到了 200.81 g/L, 转化率接近 100%。



图 7 双酶级联反应制备 β -丙氨酸

Fig. 7 Preparation of β -alanine by double enzyme cascade

表 8 双酶级联反应制备 β -丙氨酸的方法及产量

Table 8 Preparation method and yield of β -alanine by double enzyme cascade

Methods	Substrates	Enzyme	Source of <i>panD</i>	Host	Plasmid	Production/(g/L)	Yield/%	References
Coexpression	Fumaric acid	AspA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a (+)	80.4	95.3	[48]
		ADC	<i>Corynebacterium glutamicum</i>		pET28a (+)			
Coexpression	Fumaric acid	AspA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	—	118.6	—	[42]
		ADC	<i>Bacillus subtilis</i>		—			
<i>In vitro</i>	Fumaric acid	AspA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a (+)	8.02	90.0	[49]
		ADC	<i>Corynebacterium glutamicum</i>		pET24a (+)			
Coexpression	Fumaric acid	AspA	<i>E. coli</i> K12 substrain MG1655	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pRSFDuet-1	200.81	100.0	[8]
		ADC	<i>Corynebacterium glutamicum</i>		pRSFDuet-1			

注：“—”表示未有相关报道。

3.3 三酶级联法制备 β -丙氨酸

β -丙氨酸是合成辅酶 A 的重要前体，辅酶 A 在动物、植物及微生物的代谢中均发挥重要作用。但是，对拟南芥 *Arabidopsis* 基因组中所有注释蛋白进行分析，并没有发现与大肠杆菌 L-天冬氨酸- α -脱羧酶结构类似的同源蛋白，其他植物也同拟南芥类似，因此，推测植物中没有 *panD* 基因^[50]。进一步研究发现，植物中的 β -丙氨酸可由尿嘧啶经过 3 步酶降解获得，但该途径的底物转化率远低于 L-天冬氨酸- α -脱羧酶反应途径；且反应前体尿嘧啶较为昂贵，以此为底物制备 β -丙氨酸成本较高，不具备工业应用价值。

除了以尿嘧啶为底物，焦庆才等^[51]以马来酸为原料，利用马来酸异构酶（来源于 *Alcaligenes*

faecalis）、L-天冬氨酸酶（来源于 *E. coli*）和 L-天冬氨酸- α -脱羧酶（来源于 *C. glutamicum*）三酶偶联制备 β -丙氨酸，最终获得了 147.4 g/L 的 β -丙氨酸产量。WANG 等^[9]将枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）来源的 *panD* 基因和赤拟谷盗（*T. castaneum*）来源的 *panD* 基因在 *E. coli* BW25113 中共表达，构建了能表达两种不同亚型 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的重组菌；通过反应条件优化，于 500 mL 反应体系中获得了 271.5 g/L 的 β -丙氨酸。最后，将两种不同亚型 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的编码基因与 *E. coli* 来源的 *AspA* 在 *E. coli* BL21(DE3)中共表达并转化富马酸， β -丙氨酸的最高产量为 200.3 g/L，转化率高达 90.0%。三酶级联法制备 β -丙氨酸的相关数据如表 9 所示。

表 9 三酶级联法制备 β -丙氨酸及产量

Table 9 Preparation method and yield of β -alanine by three enzyme cascade

Methods	Substrates	Enzyme	Gene source	Host	Plasmid	Production/(g/L)	Yield/%	References
Coexpression	Fumaric acid	AspA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> BW25113	pYB1s	200.3	90.0	[9]
		ADC	<i>Bacillus subtilis</i>					
		ADC	<i>Tribolium castaneum</i>					
<i>In vitro</i>	Maleic acid	Maleate isomerase	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	—	147.4	96.0	[51]
		AspA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	—			
		ADC	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	—			

注：“—”表示未有相关报道；*Alcaligenes faecalis* 为粪产碱菌。

3.4 酶法制备 β -丙氨酸的调控机理及影响因素

目前，酶法制备 β -丙氨酸的影响因素主要集中在

L-天冬氨酸- α -脱羧酶性能及催化转化条件两方面。L-天冬氨酸- α -脱羧酶主要分为两类，一种属于丙酮酰基

依赖型酶, 以丙酮酰基为催化活性中心, 会发生机理性失活; 另一种属于磷酸吡哆醛依赖型酶, 在实际催化过程中需要添加 PLP 作为辅因子。丙酮酰基依赖型 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的实际催化机理并没有明确阐述, 但研究人员普遍认为, 与其他类别的丙酮酰基依赖型酶一样, 在催化过程中, 活性中心的 Arg54 会识别底物, 从而结合形成一种亚胺类物质, 在活性中心周围 Gly72、Ala73、Ala74 及 Ile85 (数字代表氨基酸在蛋白质中的位置, 3 个字母单词代表氨基酸的简称, Ala 为丙氨酸; Asp 为天冬氨酸; Arg 为精氨酸; His 为组氨酸; Ile 为异亮氨酸; Gly 为甘氨酸; Ser 为丝氨酸; Thr 为苏氨酸; Tyr 为酪氨酸, 下同) 等疏水残基的影响下生成 CO_2 。之后, 通过接受 Tyr58 位提供的质子, 由水解反应重新形成丙酮酰基活性中心^[7]。

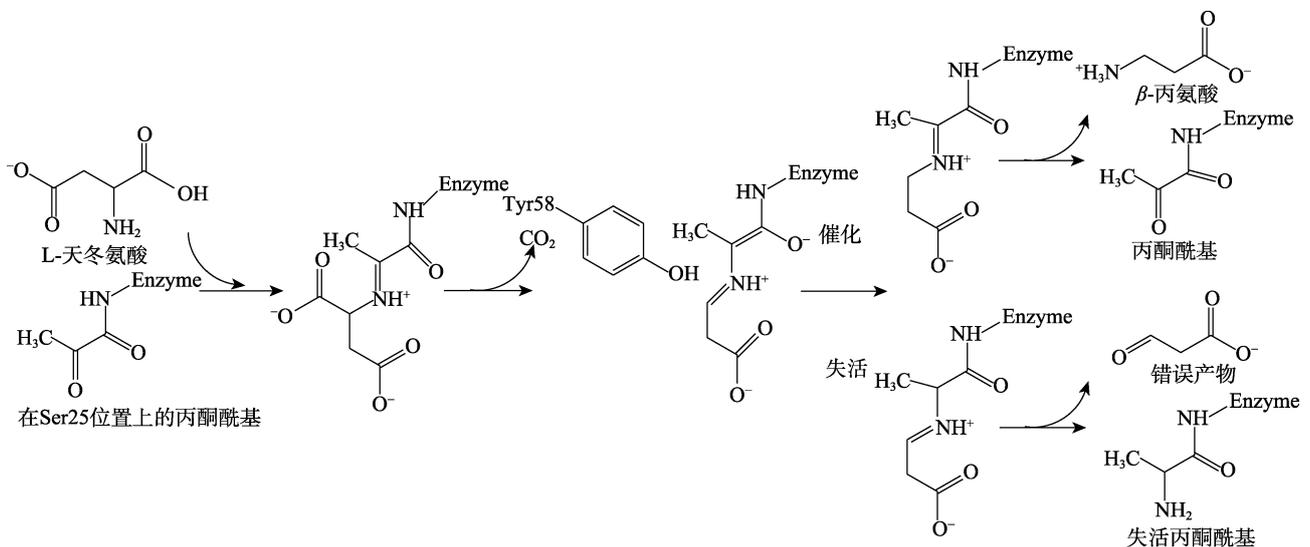


图8 L-天冬氨酸- α -脱羧酶催化和失活潜在机制^[42]

Fig. 8 Putative mechanism of catalysis and inactivation of L-aspartate- α -decarboxylase^[42]

除了 L-天冬氨酸- α -脱羧酶催化稳定性改造, 对该酶自剪切效率的改造也是重中之重。在工程菌的实际代谢过程中, L-天冬氨酸- α -脱羧酶起初以非活性蛋白 (π -蛋白) 的形式存在。随后 π -蛋白开始自剪切, 在 Gly24 和 Ser25 位置断裂从而形成 C 端带有羟基的 β -蛋白和 N 端带有丙酮酰基活性基团的 α -蛋白^[7]。研究发现, 低自剪切效率菌株 ADC 的保守氨基酸序列为 EGSCA, 高自剪切效率菌株 ADC 的保守氨基酸序列为 VGSIT, 自剪切位点附近的保守氨基酸位点 Val23、Ile26、Thr27 和 Glu56 对自剪切加工效率有重要作用^[36]。对枯草芽孢杆菌来源 *panD* 的 Tyr58、Ile60 进行突变, 会使 BsADC 活性降低或失活^[7]。

全细胞催化转化条件也是影响酶法制备 β -丙氨酸的重要因素, 对 β -丙氨酸的制备起着不可忽视的

在接受质子并重新形成丙酮酰基活性中心的过程中, 可能会发生质子的错误结合, 从而使丙酮酰基变为无活性的丙氨酸酰基, 导致 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的不可逆失活。L-天冬氨酸- α -脱羧酶催化和失活途径的机制推测如图 8 所示。目前, 普遍认为这种失活现象虽然不可避免, 但是可以通过定点突变等方式, 提高质子的正确结合率, 增加蛋白结构的稳定性, 从而削弱这种底物失活现象。研究发现, 细菌来源 ADC 的主要保守位点为 His11、Thr16、Tyr22、Gly24、Ser25、Asp29、Arg54、Thr58、Tyr59、Gly73、Ala74、Gly82、Asp83 等氨基酸。通过对保守氨基酸以外的氨基酸残基进行突变是主要研究方向。例如: 枯草芽孢杆菌来源的 BsADC 通过 I88M、V68I、E56S^[7,41] 突变及 I46V、I88M、K104S、I126*^[42] 的叠加突变可极大地提高催化稳定性。

作用。针对工程菌株的发酵条件, 通常对菌株的接种量、诱导剂种类、诱导时长、诱导温度及诱导浓度进行优化, 促使工程菌株的代谢更大地流向 β -丙氨酸生成方向。目前, 酶法转化制备 β -丙氨酸通常采取分批补料的方式以缓解 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的机理性失活, 同时对转化温度、pH、底物浓度、补料速度、金属离子、pH 调节剂种类等方面进行优化, 以增强 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的活性与稳定性。

在多酶一步催化及共表达中, 相同的催化效率是确保反应平衡的前提。由于不同种类的酶在不同 pH、温度等条件下的催化性质各异, 使得反应的兼容协调性难以实现。因此, 催化剂的反应相容性及反应协同性是实现级联反应的重要瓶颈。针对催化效率的差异, 可以通过挖掘基因组数据库、优化氨基酸序列等方式来提高低效酶的催化效率; 也可通

过优化启动子、改变基因拷贝数等方式提高低效酶的表达量,从而间接实现不同催化反应的相互协同。

4 结束语与展望

中央财经委员会第九次会议明确提出:要把“碳达峰”、“碳中和”纳入中国生态文明建设整体布局中,这对传统的化工、材料、生物等行业的发展提出了新的要求。此前,国内外均主要采取化学法进行 β -丙氨酸的生产,反应条件苛刻、副产物多,能耗大。近年来,随着绿色、环保及可持续发展理念逐渐在全世界范围形成共识,采用生物法制备 β -丙氨酸取得了较大的研究进展,并逐渐成为 β -丙氨酸的主流生产方式。中国在相关研究领域已处于世界领先地位,并且在产业化应用方面也取得了较大突破。目前,生物法制备 β -丙氨酸主要包括发酵法或酶法两种方式。首先,发酵法策略主要通过异源过量表达相关酶、敲除副产物代谢途径及强化产物合成的关键限速步骤等方式对生产菌株进行改造,使之能获得更高产率的 β -丙氨酸。目前,该法最高 β -丙氨酸产量为 72.05 g/L^[4],且存在着副产物较多、产物纯化困难及生产周期较长及等问题,尚达不到工业化生产要求;未来如能进一步提高产量及转化率,并实现产物的低成本、高效提取,将是非常具有前景的技术路线。其次,酶法转化策略主要是通过异源表达不同来源的 ADC 编码基因 *panD*, 对其进行定点突变、密码子优化等改造,使之克服天然 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的缺陷,获得更高的 β -丙氨酸产量及转化率。从转化效果及酶特性来看,枯草芽孢杆菌来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶性质最佳,且其突变体的 β -丙氨酸产量最高可达 215.3 g/L,转化率高达 94.10%^[7]。对于酶法制备 β -丙氨酸策略,除了对不同来源的 ADC 进行改进,还将其与其他酶进行联用,使之以不同的底物来制备 β -丙氨酸,以期降低底物成本,提高底物转化效率。例如, WANG 等^[9]通过三酶级联,最终获得了 200.3 g/L 的 β -丙氨酸产量与 90.0%的转化率。

虽然 β -丙氨酸生物法制备研究在催化用酶的异源表达、定性分析、发酵优化及转化应用等方面均取得了较大的进步,但仍然存在以下几个需要继续改进之处。首先,酶催化机理方面的研究还较少,尤其 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的机理性失活机制仍待进一步阐明。其次,突变体构建方面的研究大多依赖经验进行突变位点的选择及设计,研究者通常需要进行大量突变体的筛选,才能获得极少数性质得到改善的突变体^[36],极大地限制了相关酶的改造。近年来,随着人工智能、机器学习和深度学习^[52]等

技术的迅速崛起,人工设计酶蛋白逐渐成为现实^[53]。新技术的应用为相关酶催化机制的解析及人工设计改造提供新的技术手段。通过计算机辅助人工酶设计,将会理性、高效地解决当前相关酶催化效率低及易失活等问题。最后,虽然酶法制备 β -丙氨酸的成本较低、产量较高,但是单酶法、双酶法、三酶法的底物(L-天冬氨酸、富马酸、马来酸)主要是由石油原料中烃类或苯环类物质氧化而来^[54],这不是一条真正的绿色生产路线。随着石油的消耗及中国“双碳”战略目标的提出,迫切需要寻找一条更加低碳、环保的合成路径来推进 β -丙氨酸的绿色生产。

参考文献:

- [1] MENG X L (孟祥龙). Advance in application of sports nutrition supplements[J]. Journal of Food Safety and Quality (食品安全质量检测学报), 2019, 10(20): 6823-6828.
- [2] ZHENG J H (郑剑恒), ZHANG Q P (张秋萍), WU X H (吴霞红), et al. Effect of β -alanine supplementation on athletic ability[J]. Sport Science Research (体育科研), 2019, 40(3): 99-104.
- [3] HU M (胡孟). Effect of dietary L-histidine and β -alanine on growth performance, meat quality and muscle-derived active peptide in broiler chicks[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (中国农业科学院), 2018.
- [4] XU J (徐建). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the efficient production of β -alanine[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2021.
- [5] LI B (李博), SU C L (宿承璘), FAN C (范超), et al. Construction and optimization of high-yield β -alanine genetically engineered bacteria [J]. Journal of Dalian Polytechnic University (大连工业大学学报), 2019, 38(1): 1-4.
- [6] DENG S Y (邓思颖), ZHANG J L (张君丽), CAI Z (蔡真), et al. Characterization of L-aspartate- α -decarboxylase from *Bacillus subtilis* [J]. Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报), 2015, 31(8): 1184-1193.
- [7] ZHANG T H (张腾辉). Expression and modification of L-aspartate- α -decarboxylase for the whole-cell transformation of β -alanine[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2018.
- [8] CHEN M L (陈明亮), QI Y (祁瑛), XIAO Y M (肖延铭), et al. Biocatalytic synthesis of β -alanine from fumaric acid by a two-enzyme system[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology (发酵科技通讯), 2018, 47(4): 231-235.
- [9] WANG L, PIAO X, CUI S, et al. Enhanced production of β -alanine through co-expressing two different subtypes of L-aspartate- α -decarboxylase[J]. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 2020, 47(6/7): 465-474.
- [10] LÓPEZ-ÁMANO M, BELTRÁN L F L A, SÁNCHEZ-THOMAS R, et al. A novel way to synthesize pantothenate in bacteria involves β -alanine synthase present in uracil degradation pathway[J]. Microbiology Open, 2020, 9(4): e1006.
- [11] MIAO Y, LIU J, WANG X, et al. Fatty acid feedstocks enable a highly efficient glyoxylate-TCA cycle for high-yield production of β -alanine[J]. mLife, 2022, 1(2): 171-182.
- [12] KO Y S, KIM J W, CHAE T U, et al. A novel biosynthetic pathway for the production of acrylic acid through β -alanine route in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(5): 1150-1159.
- [13] XU J, ZHU Y, ZHOU Z M. Systematic engineering of the rate-limiting step of β -alanine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2021, 51: 88-94.
- [14] ZHU D (朱迪). A pathway for degradation of uracil to acetyl coenzyme A in *Bacillus megaterium*[D]. Tianjin: Tianjin University (天津大学), 2020.
- [15] ZOU X, GUO L, HUANG L, et al. Pathway construction and metabolic

- engineering for fermentative production of β -alanine in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(6): 2545-2559.
- [16] MATTHEWS J J, ARTIOLI G G, TURNER M D, et al. The physiological roles of carnosine and β -alanine in exercising human skeletal muscle[J]. Medicine Science in Sports Exercise, 2019, 51(10): 2098-2108.
- [17] TAYLAN T, ALEKSEI G, ZOEI S, et al. Lysine 2, 3-aminomutase and a newly discovered glutamate 2, 3-aminomutase produce β -amino acids involved in salt tolerance in methanogenic archaea[J]. Biochemistry, 2022, 61(11): 1077-1090.
- [18] STEVEN F D, AHMAD A, ANURADHA K, et al. Clinical, biochemical, mitochondrial, and metabolomic aspects of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase deficiency: Report of a fifth case[J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2020, 129(4): 272-277.
- [19] PARTHASARATHY A, SAVKA M A, HUDSON A O. The synthesis and role of β -alanine in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 921.
- [20] PIAO X, WANG L, LIN B, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of L-aspartate and its derivative β -alanine with high stoichiometric yield[J]. Metabolic Engineering, 2019, 54: 244-254.
- [21] LIANG S S (梁姗姗). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of β -alanine[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2017.
- [22] XU J, ZHOU L, YIN M, et al. Novel mode engineering for β -alanine production in *Escherichia coli* with the guide of adaptive laboratory evolution[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2021, 9(3): 600.
- [23] SONG C W, LEE J, KO Y S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 3-aminopropionic acid[J]. Metabolic Engineering, 2015, 30: 121-129.
- [24] WANG P, ZHOU H Y, LI B, et al. Multiplex modification of *Escherichia coli* for enhanced β -alanine biosynthesis through metabolic engineering [J]. Bioresource Technology, 2021, 342: 126050.
- [25] MIAO L, LI Y, ZHU T, et al. Metabolic engineering of methylotrophic *Pichia pastoris* for the production of β -alanine[J]. Bioresources Bioprocessing, 2021, 8(1): 1-11.
- [26] LI Y, WEI H, WANG T, et al. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1588-1602.
- [27] GONG J S (龚劲松), LI H (李恒), LU Z M (陆震鸣), et al. Recent progress in the application of nitrilase in the biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates[J]. Progress in Chemistry (化学进展), 2015, 27(4): 448-458.
- [28] JIAO B (焦标). Engineering of nitrilase and its application in biosynthesis of (*R*)-mandelic acid[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (浙江工业大学), 2016.
- [29] LAING L Y (梁璐怡), JIN S J (金少军), XU J M (徐建妙), et al. Isolation and identification of a bacterial strain G20 capable of β -aminopropionitrile bioconversion into β -alanine[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2008, 34(4): 11-15.
- [30] HAN C (韩超), YAO P Y (姚培园), YUAN J (袁京), et al. Nitrile hydrolase catalyzed the hydrolysis of β -aminopropionitrile at high concentrations to generate β -alanine through a tandem reaction strategy[C]//2014 Academic Annual Meeting of China Bioengineering Society and National Biotechnology Conference (中国生物工程学会 2014 年学术年会暨全国生物技术大会), 2014: 309-310.
- [31] HONG M (洪敏). Study on enzymatic production of β -alanine[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (浙江工业大学), 2010.
- [32] FAN H Y (范海洋). Preparation and application of recombinant *Escherichia coli* L-aspartate- α -decarboxylase[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology (华东理工大学), 2013.
- [33] ZHAO L Z (赵连真). Recombinant expression of the key gene in the enzymatic synthesis of β -alanine and its transformation research[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2013.
- [34] ZHANG X X (张潇潇). Cloning and expression of L-aspartate- α -decarboxylase gene in *C. renatum*[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (浙江工业大学), 2008.
- [35] CHEN X L (陈夏林). Identification of L-aspartate decarboxylase encoding genes and analysis of enzyme function[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2017.
- [36] MO Q (莫芹). Molecular mechanism of the catalytic inactivation of L-aspartate α -decarboxylase[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2019.
- [37] FENG Z, ZHANG J, CHEN G, et al. Extracellular expression of L-aspartate- α -decarboxylase from *Bacillus tequilensis* and its application in the biosynthesis of β -alanine[J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2019, 189(1): 273-283.
- [38] LIU Z, ZHENG W, YE W, et al. Characterization of cysteine sulfinic acid decarboxylase from *Tribolium castaneum* and its application in the production of β -alanine[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2019, 103(23): 9443-9453.
- [39] SHI Z X (石增秀). Structural constraints and properties of *Corynebacterium glutamicum* aspartate decarboxylase, *PanD*[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2013.
- [40] SHEN Y, ZHAO L, LI Y, et al. Synthesis of β -alanine from L-aspartate using L-aspartate- α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(8): 1681-1686.
- [41] PEI W, ZHANG J, DENG S, et al. Molecular engineering of L-aspartate- α -decarboxylase for improved activity and catalytic stability[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2017, 101(15): 6015-6021.
- [42] QIAN Y, LU C, LIU J, et al. Engineering protonation conformation of L-aspartate- α -decarboxylase to relieve mechanism-based inactivation [J]. Biotechnology Bioengineering, 2020, 117(6): 1607-1614.
- [43] YE W Q (叶文琪), XUE L (薛岚), WANG C (王超), et al. Modification of aspartate α -decarboxylase from *Tribolium castaneum* and its application in producing β -alanine[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2019, 45(11): 7-13.
- [44] WANG C (王超). Thermostability modification of L-aspartate α -decarboxylase for the whole-cell biocatalysis of β -alanine[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2019.
- [45] CHEN H (陈虹). Protein engineering of a L-aspartate- α -decarboxylase and its application in the β -alanine production[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (浙江工业大学), 2019.
- [46] YE W Q, XUE L, WANG C, et al. Characterization of enzymatic properties of an insect-derived L-aspartate- α -decarboxylase variant [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(19): 63-67.
- [47] TOMITA H, YOKOOJI Y, ISHIBASHI T, et al. An archaeal glutamate decarboxylase homolog functions as an aspartate decarboxylase and is involved in β -alanine and coenzyme A biosynthesis[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(6): 1222-1230.
- [48] QIAN Y, LIU J, SONG W, et al. Production of β -alanine from fumaric acid using a dual-enzyme cascade[J]. ChemCatChem, 2018, 10(21): 4984-4991.
- [49] GAO Y (高宇), LIU Z M (刘中美), LIU K (刘克), et al. Biocatalytic access to β -alanine by a two-enzyme cascade synthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报), 2017, 33(5): 875-879.
- [50] OTTENHOF H H, ASHURST J L, WHITNEY H M, et al. Organisation of the pantothenate (vitamin B5) biosynthesis pathway in higher plants[J]. The Plant Journal, 2004, 37(1): 61-72.
- [51] JIAO Q C (焦庆才), LIU J Z (刘均忠), WEI Y (魏宇), et al. The invention relates to a method for preparing β -alanine by multi-enzyme coupling with maleic acid as raw material: CN107012180A [P]. 2017-08-04.
- [52] JIANG Y Y (蒋迎迎), QU G (曲戈), SUN Z T (孙周通). Machine learning- assisted enzyme directed evolution[J]. Journal of Biology (生物学杂志), 2020, 37(4): 1-11.
- [53] QU G (曲戈), ZHU T (朱彤), JIANG Y Y (蒋迎迎), et al. Protein engineering: From directed evolution to computational design[J]. Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报), 2019, 35(10): 1843-1856.
- [54] LIU H (刘欢). Fumaric acid production by fermentation of lignocellulose and research of the gene expression mechanism regulated by nitrogen source[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology (北京化工大学), 2019.