改造乙酰羟酸合成酶提高 *L*–亮氨酸产量

刘　宁[1,2]，　徐建中[*1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要： 乙酰羟酸合成酶（acetohydroxy acid synthase，AHAS，编码基因 *ilvBN*）是 *L*–亮氨酸合成途径的第一个限速酶。以谷氨酸棒杆菌 XL–3（*Corynebacterium glutamicum* XL–3）为底盘细胞，通过分析并改造 AHAS 增加其对底物丙酮酸的偏好性，从而提高 *L*–亮氨酸产量。首先利用 AHAS 的氨基酸序列进行同源建模，根据蛋白质结构进行丙氨酸扫描，找到突变的潜在位点，通过测定突变体酶活力和重组菌株的 *L*–亮氨酸产量寻找最适突变体。测定结果发现将 157 位 Gln 突变成 Arg 能够有效提高 AHAS 催化丙酮酸的能力，最终重组菌株的 *L*–亮氨酸产量达到（23.5±1.8）g/L，比出发菌株谷氨酸棒杆菌 XL–3 增加了 51%，同时副产物 *L*–异亮氨酸产量有所下降。因此，通过对 AHAS 的理性改造促进了 *L*–亮氨酸的合成，该研究结果对后续利用蛋白质工程强化微生物合成 *L*–亮氨酸等支链氨基酸具有重要的参考价值。

关键词： 乙酰羟酸合成酶；谷氨酸棒杆菌；*L*–亮氨酸；支链氨基酸；蛋白质改造

中图分类号：Q 814.9　**文章编号：**1673–1689（2023）09–0045–11　**DOI：**10.12441/spyswjs.20220228003

Improvement of *L*–Leucine Production by Modifying Acetohydroxy Acid Synthase

LIU Ning[1,2]，　*XU Jianzhong*[*1,2]

（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China；2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract： Acetohydroxy acid synthase （AHAS, encoded by the gene *ilvBN*) is the first rate-limiting enzyme in *L*-leucine synthesis pathway. *Corynebacterium glutamicum* XL-3 was used as the chassis cell to increase its preference for pyruvate and improve the yield of *L*-leucine by analyzing and modifying AHAS. Initially, the amino acid sequence of AHAS was used for homologous modeling. Then potential mutation sites were identified through alanine scanning of the protein structure. The optimal mutant was selected by measuring the catalytic activity of the mutant and the *L*-leucine yield of the recombinant strain. The results showed that substituting Gln157 with Arg effectively enhanced the ability of AHAS to catalyze pyruvate, resulting in a final *L*-leucine production of （23.5±1.8) g/L in the recombinant strain, which was a 51% increase compared to the parent strain *Corynebacterium glutamicum* XL-3. In addition, the yield of by-products *L*-isoleucine decreased. Therefore, the rational modification of AHAS could promote the synthesis of *L*-leucine. The research results have

收稿日期： 2022–02–28　**修回日期：** 2022–05–08

基金项目： 江苏省研究生科研与实践创新计划项目（SJCX20_0745）。

* **通信作者：** 徐建中（1984—），男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事微生物代谢改造研究。E–mail：xujianzhong@jiangnan.edu.cn

important implications for the subsequent use of protein engineering to strengthen the microbial synthesis of branched-chain amino acids such as *L*-leucine.

Keywords: acetohydroxy acid synthase, *Corynebacterium glutamicum*, *L*-leucine, branched-chain amino acids, protein engineering

L-亮氨酸是主要的支链氨基酸之一,主要应用于食品、医药、动物饲料和化妆品行业。目前工业生产 *L*-亮氨酸的主要方法是微生物发酵法、直接提取法和化学合成法[1]。微生物发酵法由于成本低、环境友好等优点而被广泛运用,工业常用的菌株为谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌[2]。在谷氨酸棒杆菌中,*L*-亮氨酸生物合成与 *L*-异亮氨酸和 *L*-缬氨酸合成密切相关,因为这 3 个支链氨基酸都以丙酮酸为前体,并且代谢步骤中经过 4 个相同的酶催化反应[3-4],依次由乙酰羟酸合成酶(AHAS,编码基因 *ilvBN*)、乙酰羟酸异构还原酶(AHAIR,编码基因 *ilvC*)、二羟酸脱氢酶(DHAD,编码基因 *ilvD*)以及支链氨基酸转氨酶(TAs,编码基因 *ilvE*)催化(见图 1)[5-6]。其中 AHAS 是由两个 *ilvB* 基因编码的大亚基(催化亚基)和两个 *ilvN* 基因编码的小亚基(调节亚基)组成的四聚体。它是合成途径中的第一个限速酶,其调节亚基受 *L*-亮氨酸、*L*-缬氨酸和 *L*-异亮氨酸的协同反馈阻遏,作用原理是其能与 AHAS 的调节位点结合,从而抑制 AHAS 活性[7]。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)和鼠伤寒杆菌(*Salmonella typhimurium*)中,AHAS 存在 3 种同工酶,分别是 AHASI、AHASII 和 AHASIII,由操纵子 *ilvBN*、*ilvGMEDA* 和 *ilvIH* 所编码,但并不是全部的细菌都有多种 AHAS 同工酶,在谷氨酸棒杆菌中就只存在一种 AHAS。在谷氨酸棒杆菌中,AHAS 主要是受 *L*-缬氨酸的反馈抑制,并且其可以同时催化 2 个反应,第一个反应是催化丙酮酸生成 2-乙酰乳酸,进入 *L*-亮氨酸和 *L*-缬氨酸的合成途径;第二个反应则是催化 2-酮基丁酸和丙酮酸生成 2-乙酰-2-羟基丁酸,进而合成 *L*-异亮氨酸[8-9]。因此,AHAS 在支链氨基酸的合成过程中占有重要的地位。

目前对 AHAS 的蛋白质改造主要集中于降低其对支链氨基酸的敏感性,从而来降低支链氨基酸的反馈抑制[10]。Guo 等发现 A42V、A89V、K136E、A42V、A89V 这些突变位点对于 AHAS 的蛋白质改造具有一定意义[11];Zhang 等首先过表达基因 *ilvBN*,然后将 47 位异亮氨酸突变成酪氨酸来减少

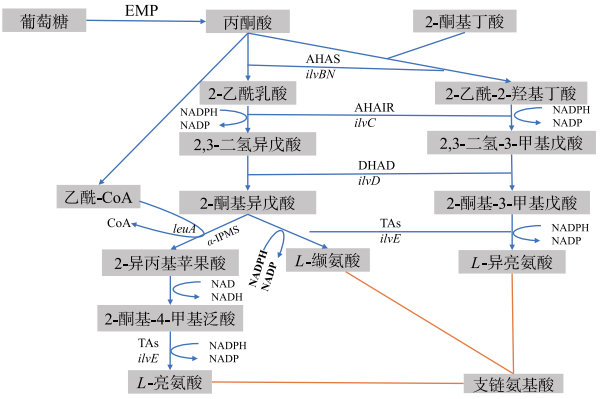


图 1 *L*-亮氨酸合成代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathway of synthetic *L*-leucine

反馈抑制,最终重组菌株的 *L*-亮氨酸产量达到了 32.1 g/L[12];Hasegawa 等发现如果将谷氨酸棒杆菌中 *ilvN* 基因的 156 位 Gly 定点突变成 Glu,并且敲除谷氨酸棒杆菌中的 *ldhA* 基因,同时过表达 *ilvBNCDE* 可以有效提高 AHAS 抗反馈抑制的能力,结合工艺优化后 *L*-缬氨酸产量可达 227 g/L[13];Lu 等通过定点诱变技术,定点诱变 AHAS 调节亚基上的位点(N11S、T34I、A36V、T104S、N11F、G14E 和 N29H),使突变体对 *L*-异亮氨酸敏感性显著下降[14]。同时,在代谢工程方面对 AHAS 的改造也有一定的进展。Hou 等在黄色短杆菌中串联表达经定点突变的 *ilvEBN'C* 基因,*L*-缬氨酸产量达到了 38 g/L[15];Wang 等将基因 *ilvBNC* 的原始启动子替换成 P_{tuf} 启动子后,重组菌株最终摇瓶发酵可获得 28.47 g/L 的 *L*-亮氨酸[7];崔毅引入 *L*-缬氨酸生产菌中的 AHAS 突变体,最终分批补料发酵生产 39.8 g/L 的 *L*-亮氨酸[9];陈宁等改变中心碳代谢途径,最终使得 *L*-亮氨酸的产量(53.0 g/L)提高 10.0%[16]。

在谷氨酸棒杆菌中,AHAS 对 2-酮基丁酸的亲和力明显高于丙酮酸,所以当丙酮酸和 2-酮基丁酸同时存在时,AHAS 会优先利用 2-酮基丁酸合成 *L*-异亮氨酸[17]。由此可以推测出当存在较高含量的 2-酮基丁酸时,可能会造成 *L*-缬氨酸和 *L*-亮氨酸的合成受限制而造成生长缺陷[18],从而不利于 *L*-亮氨酸的积累。作者通过蛋白质改造工程对AHAS 进

行理性改造，针对其底物偏好性做出优化，利用同源建模和分子模拟找出合适突变位点，筛选出最优突变体来提高 AHAS 对丙酮酸的催化能力，从而提高 *L*-亮氨酸产量。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

异丙基 *β*-*D*-硫代半乳糖苷（IPTG）、2×Phanta Max Master Mix、2×Tag Max Master Mix（Dye Plus）、卡那霉素：南京诺唯赞生物科技有限公司产品；限制性内切酶、DNA 连接酶：赛默飞世尔科技有限公司产品；酵母提取物、胰蛋白胨：英国 Oxoid 公司产品；质粒提取试剂盒、基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒、定点突变试剂盒：上海生工生物工程股份有限公司产品。

1.2　菌株与质粒

出发菌株为作者所在实验室保藏的 *C. glutamicum* XL-3，由菌株 *C. glutamicum* XQ-9 诱变而来的一株 *L*-亮氨酸生产菌株[19]。本研究中利用质粒 pET-28a 进行蛋白质表达，利用质粒 pK18*mobsacB* 进行基因的敲除或替换，大肠杆菌 JM109 用于质粒构建，大肠杆菌 BL21(DE3)用于表达目的蛋白质。本实验中所用的主要菌株与质粒如表 1 所示，所用引物如表 2 所示。

表 1　本研究中用到的菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this study

主要菌株以及质粒		相关特性	来源
菌株	*C. glutamicum* XL-3	*L*-亮氨酸生产菌株	作者所在实验室保藏
	BL21/pET-28a-*ilvBN*	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-*ilvBN*	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Arg138Lys}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Arg138Lys}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Gln154Lys}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Gln154Lys}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Gln157Arg}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Gln157Arg}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr/Arg138Lys}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr/Arg138Lys}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr/Gln154Lys}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr/Gln154Lys}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr/Gln157Arg}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr/Gln157Arg}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Arg138Lys/Gln154Lys}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Arg138Lys/Gln154Lys}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Arg138Lys/Gln157Arg}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Arg138Lys/Gln157Arg}$	本研究构建
	BL21/pET-28a-$ilvBN^{Gln154Lys/Gln157Arg}$	菌株 *E. coli* BL21 携带质粒 pET-28a-$ilvBN^{Gln154Lys/Gln157Arg}$	本研究构建
	C. glutamicum XL-3-1	菌株 *C. glutamicum* XL-3 携带突变基因 $ilvBN^{Gln157Arg}$	本研究构建
质粒	pET-28a	表达质粒	作者所在实验室保藏
	pK18*mobsacB*	*C. glutamicum* 中敲除质粒	作者所在实验室保藏
	pET-28a-*ilvBN*	pET-28a 携带基因 *ilvBN*	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Ser38Ala}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvBN^{Ser38Ala}$	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Ile92Ala}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvBN^{Ile92Ala}$	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Pro134Ala}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvBN^{Pro134Ala}$	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Arg138Ala}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvBN^{Arg138Ala}$	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Gln154Ala}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvBN^{Gln154Ala}$	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Ser155Ala}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvBN^{Ser155Ala}$	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Gln157Ala}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvB^{Gln157Ala}$	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Ser38Thr}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvBN^{Ser38Thr}$	本研究构建
	pET-28a-$ilvBN^{Arg138Lys}$	pET-28a 携带突变基因 $ilvBN^{Arg138Lys}$	本研究构建

续表 1

主要菌株以及质粒		相关特性	来源
质粒	pET-28a-*ilvBN*^{Gln154Lys}	pET-28a 携带突变基因 *ilvBN*^{Gln154Lys}	本研究构建
	pET-28a-*ilvBN*^{Gln157Arg}	pET-28a 携带突变基因 *ilvBN*^{Gln157Arg}	作者所在实验室保藏
	pET-28a-*ilvBN*$^{Ser38Thr/Arg138Lys}$	pET-28a 携带突变基因 *ilvBN*$^{Ser38Thr/Arg138Lys}$	本研究构建
	pET-28a-*ilvBN*$^{Ser38Thr/Gln154Lys}$	pET-28a 携带突变基因 *ilvBN*$^{Ser38Thr/Gln154Lys}$	本研究构建
	pET-28a-*ilvBN*$^{Ser38Thr/Gln157Arg}$	pET-28a 携带突变基因 *ilvBN*$^{Ser38Thr/Gln157Arg}$	本研究构建
	pET-28a-*ilvBN*$^{Arg138Lys/Gln154Lys}$	pET-28a 携带突变基因 *ilvBN*$^{Arg138Lys/Gln154Lys}$	本研究构建
	pET-28a-*ilvBN*$^{Arg138Lys/Gln157Arg}$	pET-28a 携带突变基因 *ilvBN*$^{Arg138Lys/Gln157Arg}$	本研究构建
	pET-28a-*ilvBN*$^{Gln154Lys/Gln157Arg}$	pET-28a 携带突变基因 *ilvBN*$^{Gln154Lys/Gln157Arg}$	本研究构建
	pK18*mobsacB*-*ilvBN*	pK18*mobsacB* 携带基因 *ilvBN*	本研究构建
	pK18*mobsacB*-*ilvBN*^{Gln157Arg}	pK18*mobsacB* 携带突变基因 *ilvBN*^{Gln157Arg}	本研究构建

表 2　本研究中用到的引物

Table 2　Primers used in this study

引物	序列(5′—3′)	限制性酶
pET-28a-*ilvBN*-F	CGCGGATCCGTGAATGTGGCAGCTTCTC	*Bam*H Ⅰ
pET-28a-*ilvBN*-R	CCGGAATTCTTAGATCTTGGCCGGAG	*Eco*R Ⅰ
ilvBN^{Ser38Ala}-F	ACCTCGTGGCCCTCGTGTCTGCAAAGACCG	
ilvBN^{Ser38Ala}-R	ACACGAGGGCCACGAGGTTGAATGCGCGTC	
ilvBN^{Ile92Ala}-F	CCCGCGCAGCCATGCTGGTTAAGGTCTCT	
ilvBN^{Ile92Ala}-R	TAACCAGCATGGCTGCGCGGGCGATAGTG	
ilvBN^{Pro134Ala}-F	CAGGCACCGCCGGCAAGCTCCGCGCACTG	
ilvBN^{Pro134Ala}-R	GAGCTTGCCGGCGGTGCCTGTGGATTCAAT	
ilvBN^{Arg138Ala}-F	GCAAGCTCGCCGCACTGCTTGACGTGAT	
ilvBN^{Arg138Ala}-R	GCAGTGCGGCGAGCTTGCCTGGGGTGCC	
ilvBN^{Gln154Ala}-F	ACTGATCGCCTCCGGACAGATTGCACTC	
ilvBN^{Gln154Ala}-R	TCTGTCCGGAGGCGATCAGTTCGCGGA	
ilvBN^{Ser155Ala}-F	ACTGATCCAAGCCGGACAGATTGCACTC	
ilvBN^{Ser155Ala}-R	TCTGTCCGGCTTGGATCAGTTCGCGGA	
ilvBN^{Gln157Ala}-F	TCCGGAGCCATTGCACTCAACCGCGGTCC	
ilvBN^{Gln157Ala}-R	GTGCAATGGCTCCGGATTGGATCAGTT	
ilvBN^{Ser38Thr}-F	ACCTCGTGACCCTCGTGTCTGCAAAGACCG	
ilvBN^{Ser38Thr}-R	ACACGAGGGTCACGAGGTTGAATGCGCGTC	
ilvBN^{Arg138Lys}-F	GCAAGCTCAAGGCACTGCTTGACGTGAT	
ilvBN^{Arg138Lys}-R	GCAGTGCCTTGAGCTTGCCTGGGGTGCC	
ilvBN^{Gln154Lys}-F	ACTGATCAAGTCCGGACAGATTGCACTC	
ilvBN^{Gln154Lys}-R	TCTGTCCGGACTTGATCAGTTCGCGGA	
ilvBN^{Gln157Arg}-F	TCCGGACGCATTGCACTCAACCGCGGTCC	
ilvBN^{Gln157Arg}-R	GTGCAATGCGTCCGGATTGGATCAGTT	
pK18-*ilvBN*-F	CCGGAATTCGTGAATGTGGCAGCTTC	*Eco*R Ⅰ
pK18-*ilvBN*-R	GCTCTAGATTAGATCTTGGCCGGAGCCAT	*Xba* Ⅰ
pK18-*ilvBN*^{Gln157Arg}-F	TCCGGACGCATTGCACTCAACCGCGGTCC	
pK18-*ilvBN*^{Gln157Arg}-R	GTGCAATGCGTCCGGATTGGATCAGTT	

1.3　培养基与诱导表达

LB 培养基(g/L)：胰蛋白胨 10、酵母提取物 5、NaCl 10。LBG 培养基：葡萄糖 5、胰蛋白胨 10、酵母提取物 5、NaCl 10。EPO 培养基：在 LBG 培养基的基础上添加 30 g/L 甘氨酸、4 g/L 异烟肼和 1 g/L 吐温-80。LBHIS 培养基：在 LB 培养基的基础上添加 91 g/L 山梨醇和 18.5 g/L 脑心浸出液。种子培养基(g/L)：葡萄糖 30、玉米浆 30、硫酸铵 5、酵母浸膏 10、柠檬酸钠 10、$K_2HPO_4·3H_2O$ 1.3、$MnSO_4·4H_2O$ 0.01、$MgSO_4·7H_2O$ 0.4、生物素 2×10^{-4}、硫胺素 3×10^{-4} 和 *L*-蛋氨酸 0.4。发酵培养基(g/L)：葡萄糖 130、玉米浆 25、醋酸铵 15、硫酸铵 15、柠檬酸钠 2、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5、$K_2HPO_4·3H_2O$ 1.3、*L*-蛋氨酸 0.7、*L*-异亮氨酸 0.06、*L*-谷氨酸 0.5、$MnSO_4·H_2O$ 0.01、生物素 1×10^{-4}、硫胺素 2×10^{-4}、$CaCO_3$ 30。

大肠杆菌在 LB 培养基中生长，培养条件是37 ℃、100 r/min。谷氨酸棒杆菌在 LBG 培养基中生长，培养条件是 30 ℃、100 r/min[20]。使用 EPO 培养基和 LBHIS 培养基构建谷氨酸棒杆菌重组菌株[21]。此外，用 50 μg/mL 卡那霉素构建质粒，用 25 μg/mL 卡那霉素筛选重组菌株。

诱导表达：将大肠杆菌 BL21(DE3)接种于 10 mL 液体 LB 培养基中，在 37 ℃、100 r/min 的摇床中培养 10~12 h，然后以 5%接种体积分数转移到 TB 培养基中。当菌液 $OD_{600\ nm}$ 达到 0.5~0.6 时加入诱导剂 IPTG(0.5 mmol/L)，然后放置于 16 ℃、100 r/min 的摇床中培养 16~20 h。将诱导表达培养后的菌体在 4 ℃下以 10 000 r/min 离心 10 min，用体积分数 2%的冷 KCl 溶液洗涤细胞 2 次。然后用 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)悬浮细胞。利用超声破碎仪进行细胞破碎 15~20 min，然后离心收集上清液，则为粗酶液[11]。

1.4　蛋白质纯化

首先将粗酶液通过 0.45 μm 孔径的过滤头进行过滤处理，然后用结合液（10 mmol/L 咪唑、100 mmol/L 磷酸钾缓冲液，pH 7.4，15 mL)清洗纯化柱。用洗脱液（300 mmol/L 咪唑、100 mmol/L 磷酸钾缓冲液，pH 7.4，15 mL)洗脱挂柱的蛋白质。洗脱时间为 20 min，洗脱过程中结合液和洗脱液体积比从 90:10 至 40:60。纯化后的酶在 4 ℃或-80 ℃下保存。

1.5　分析方法

1.5.1　软件分析　本研究中使用了蛋白质分析软件 Schordinger、PyMOL 以及同源建模网站 Swissmodel。

1.5.2　目的产物测定　目的产物以及支链氨基酸主要通过高效液相色谱测定[22]。色谱柱为 Agilent HC-C_{18}(4.6 mm×250 mm，5 μm)，流动相 A 为乙腈-水溶液（体积比 60:40），流动相 B 为乙腈-0.014 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.2，体积比 20:80)，流量为 1.0 mL/min，柱温为 30 ℃，检测波长为 360 nm，进样体积为 10 μL，每个样品 30 min，最终流动相 A 与 B 的体积比为 80:20。

1.5.3　酶活力测定　反应体系为磷酸钾缓冲液（100 mmol/L，pH 7.4)，含 50 mmol/L 丙酮酸钠、10 mmol/L $MgCl_2$、100 mmol/L 硫胺素焦磷酸盐(TPP)和 100 mmol/L 黄素腺嘌呤二核苷酸。首先添加 100 μL 酶液至 2.5 mg 磷酸钾缓冲液中开始反应，然后在 37 ℃下孵育 1 h，最后添加 200 μL 3 mol/L H_2SO_4 终止反应，混合物在 60 ℃处理15 min。1 mL 体积分数 0.5%肌酸和 1 mL 体积分数 5% α-萘酚(在 2.5 mol/L NaOH 中进行制备)添加到混合物中，然后在 60 ℃处理 20 min，最终在 525 nm 处测量反应的吸光度。对照组以同样的方式进行处理。一个酶活力单位被定义为每毫克蛋白质每分钟形成的 1 nmol 乙酰乳酸[11]。

1.6　谷氨酸棒杆菌双交换同源重组策略

谷氨酸棒杆菌双交换同源重组策略如图 2 所示[23]，整个过程使用自杀型质粒 pK18*mobsacB*。首先通过融合 PCR 技术将要敲除或替换基因的同源臂进行融合，获得目的片段，然后将目的片段通过酶切酶连技术与空质粒载体 pK18*mobsacB* 连接在一起，获得敲除或替换质粒。将质粒电转入提前制备好的谷氨酸棒杆菌感受态中完成第一次同源重组，这一步骤通过卡那霉素抗性以及琼脂糖凝胶电泳进行筛选，成功获得完成一次同源的菌株之后进行二次同源筛选。由于质粒 pK18*mobsacB* 携带了 *sacB* 基因，此基因编码的蛋白质使得完成一次同源的菌株不能在含有蔗糖的培养基中生存，利用 *sacB* 蔗糖致死原理将质粒从菌株中脱落来完成二次同源，从而获得目的重组菌株。

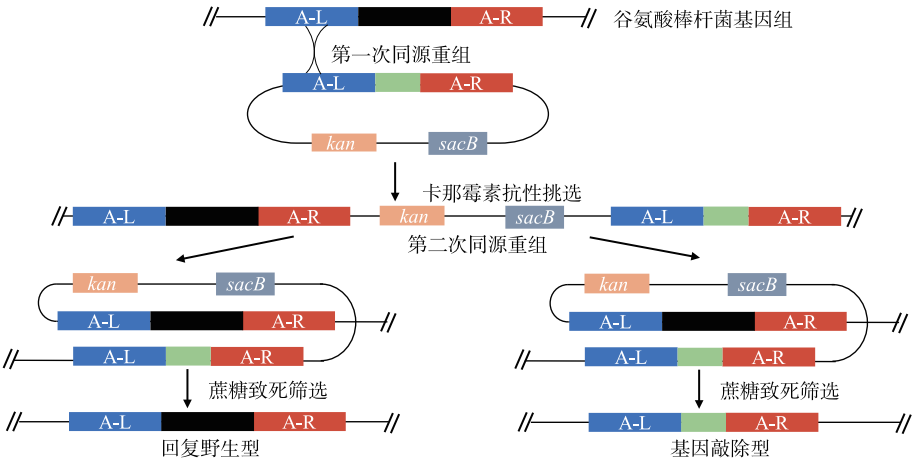


图 2　pK18*mobsacB* 敲除基因流程

Fig. 2　Gene knockout of pK18*mobsacB* plasmid

2 结果与分析

2.1　突变位点的选择

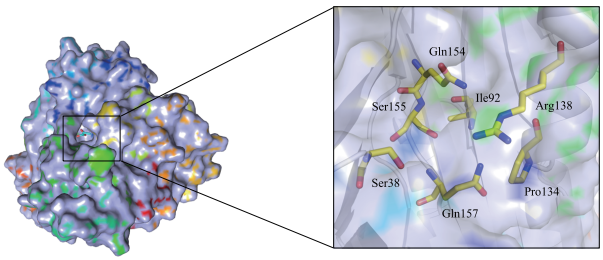
AHAS 是由基因 *ilvBN* 编码的合成支链氨基酸的第一个限速酶，是由两个大亚基和两个小亚基组成的四聚体，效应物主要与小亚基结合，使小亚基结构改变达到催化底物的作用，所以后续的蛋白质改造主要针对 AHAS 的小亚基结构（编码基因 *ilvN*）进行突变改造。代谢过程中丙酮酸与小亚基结合，催化两分子丙酮酸脱羧缩合形成 2-乙酰乳酸，同时也可催化一分子丙酮酸与一分子 2-酮基丁酸缩合形成 2-乙酰-2-羟基丁酸。当丙酮酸和 2-酮基丁酸同时存在时，AHAS 会优先利用 2-酮基丁酸合成 *L*-异亮氨酸，而为了使 *L*-亮氨酸的产量进一步得到优化，本研究中尝试突变 AHAS 使其更偏向催化丙酮酸生成 2-乙酰乳酸，用于合成目的产物。考虑到想要改变酶对底物丙酮酸的亲和性，首先增加酶与底物的结合稳定性，所以研究过程中主要针对 AHAS 与丙酮酸底物结合位点 4 Å 范围内的氨基酸残基进行突变。

目前还未有报道谷氨酸棒杆菌中 AHAS 小亚基精确的蛋白质结构，所以首先利用了同源建模网站 Swissmodel 进行 AHAS 蛋白质结构的预测，以 2pc6A(2.5 Å)作为模板同源建模得到了 AHAS 小亚基的蛋白质结构。通过分子对接软件 Schordinger 将小亚基和丙酮酸进行对接，然后将对接结构导入 PyMOL 进行分析[24]。结果如图 3(a)所示，对接之后发现 Ser38、Ile92、Pro134、Arg138、Gln154、Ser155 和 Gln157 位于丙酮酸结合位点附近，推测这 7 个氨基酸残基可能对底物丙酮酸的结合有一定的作用。为了找出对底物结合有重要作用的氨基酸残基，分别将以上 7 个氨基酸突变成丙氨酸，并测定突变酶催化丙酮酸的酶活力。

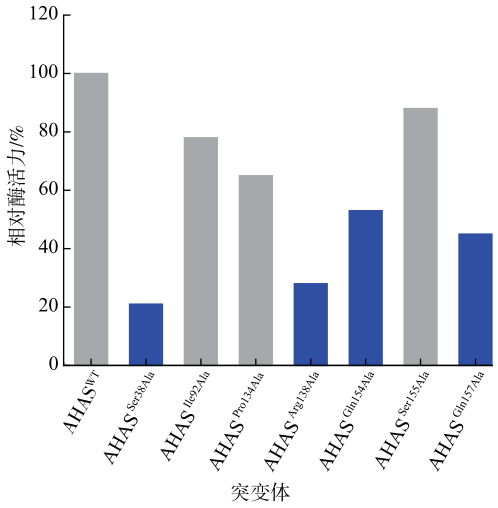
突变体酶活力测定结果如图 3(b)所示，可以看出，对比 $AHAS^{WT}$(野生型)，突变体 $AHAS^{Ile92Ala}$、$AHAS^{Pro134Ala}$ 以及 $AHAS^{Ser155Ala}$ 的酶活力变化较小，推测可能不是催化过程中关键的氨基酸残基，而突变体 $AHAS^{Ser38Ala}$、$AHAS^{Arg138Ala}$、$AHAS^{Gln154Ala}$ 和 $AHAS^{Gln157Ala}$ 的酶活力明显下降，分别下降至初始酶活力的 21%、28%、53%和 45%，在一定程度上说明这 4 个位点可能对丙酮酸底物结合口袋比较重要。通过分子模拟软件进一步分析以上位点与丙酮酸的相互作用，结果如图 3(c)所示，Ser38、Arg138 与底物丙酮酸之间形成氢键，理论上这两个氨基酸残基对于酶催化底物起着关键的作用，同时这也可能是导致突变体 $AHAS^{Ser38Ala}$ 和 $AHAS^{Arg138Ala}$ 酶活力明显下降的原因。Gln154 和 Gln157 虽然与丙酮酸没有直接的相互作用力，但是其突变成 Ala 后酶活力也受到了较大的影响，推测这两个位点可能对催化反应有重要的作用。因此后续研究将围绕这 4 个位点进行定点突变来提高酶活力。

2.2　突变体筛选

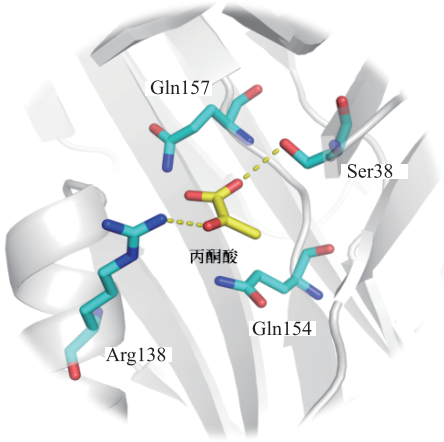
目前对于蛋白质改造主要通过序列比对、分子模拟技术以及定点突变挖掘潜在保守位点，将氨基酸突变成性质相同或者相反的氨基酸，可能使蛋白质与分子间形成新的空间构象或者形成新的键，从



（a）分子对接结果



（b）丙氨酸扫描突变体相对酶活力



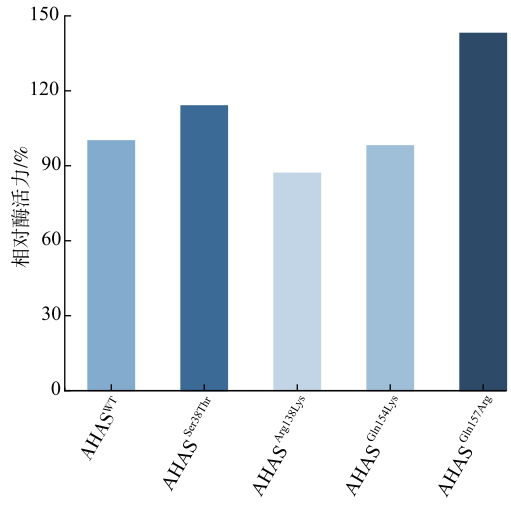
（c）4个位点与丙酮酸分子对接结果

图 3　分子对接以及突变体的酶活力分析结果

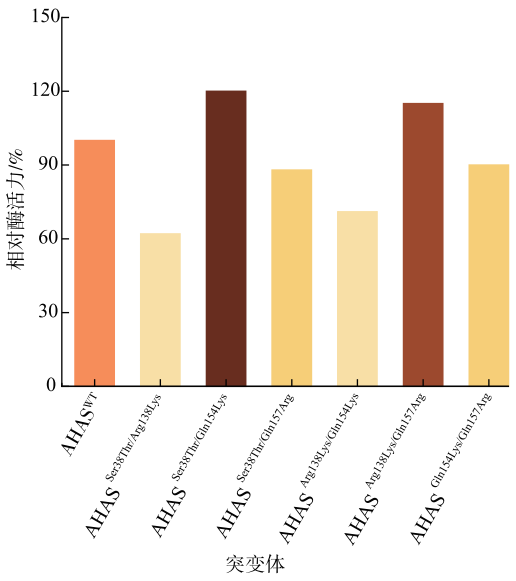
Fig. 3　Results of molecular docking and enzyme activity analysis of mutants

而导致两者结合更加紧密，也可能使底物结合口袋发生变化使得蛋白质对底物的偏好性发生改变。为了进一步对 Ser38、Arg138、Gln154 和 Gln157 这 4 个位点进行研究，尝试进行以下突变 Ser38Thr、Arg138Lys、Gln154Lys 以及 Gln157Arg，通过定点突变试剂盒得到突变质粒，将质粒转化到菌株大肠杆菌 BL21（DE3）中获得重组菌株 BL21/pET-28a-*ilvBN*^{Ser38Thr}、BL21/pET -28a -*ilvBN*^{Arg138Lys}、BL21/pET -28a-*ilvBN*^{Gln154Lys} 和BL21/pET-28a-*ilvBN*^{Gln157Arg}，酶活力测定方法参考 1.5.3 部分。

单突变体酶活力测定结果如图 4（a）所示，与 AHAS^{WT} 相比较，AHAS^{Arg138Lys} 和AHAS^{Gln154Lys} 分别下降了 13%和 2%，但是 AHAS^{Ser38Thr} 和 AHAS^{Gln157Arg} 的酶活力分别上升了 14%和 41%，结果表明通过单突变使得酶活力有了一定的提升。为了进一步提高酶活力，将选择的 4 种突变体分别进行两两组合突变，从而获得了新的突变体 AHAS$^{Ser38Thr/Arg138Lys}$、AHAS$^{Ser38Thr/Gln154Lys}$、AHAS$^{Ser38Thr/Gln157Arg}$、AHAS$^{Arg138Lys/Gln154Lys}$、AHAS$^{Arg138Lys/Gln157Arg}$ 以及 AHAS$^{Gln154Lys/Gln157Arg}$。双突变体酶活力测定结果如图 4(b)所示，突变体 AHAS$^{Ser38Thr/Gln154Lys}$ 和 AHAS$^{Arg138Lys/Gln157Arg}$ 的酶活力与 AHAS^{WT} 相比分别上升了 20% 和 14%，但是都没有单突变体 AHAS^{Gln157Arg} 酶活力高，推测可能是组合突变对酶的催化空间构型产生了较大的影响，使得蛋白质与底物结合不紧密。实验中测定了野生型和突变体酶对丙酮酸的动力学参数，结果如表 3 所示，与 AHAS^{WT} 相比，突变体 AHAS^{Gln157Arg} 对底物丙酮酸的 K_m 值下降，说明将 AHAS 的 157 位从 Gln 突变为 Arg 后在一定程度上改变了底物偏好性，提高了酶对丙酮酸的催化能力。同时从表中可以得到突变体 AHAS^{Gln157Arg} 的 K_{cat}/K_m 高于 AHAS^{WT}，所以突变酶与野生酶相比有更高的催化效率，最终选择 AHAS^{Gln157Arg} 为最优突变体。



（a）单突变体相对酶活力



（b）双突变体相对酶活力

图 4　突变体的酶活力分析

Fig. 4　Enzyme activity analysis of mutants

2.3　AHAS 及突变体结构分析

通过上述实验得到了一个最佳的突变体 $AHAS^{Gln157Arg}$，提高了酶活力，且显著提高了 AHAS 对底物丙酮酸的亲和性。为了进一步探究酶活力提高的原因，利用蛋白质分子软件对突变体进行解析。首先利用分子对接软件 Schordinger 将突变后的酶与底物丙酮酸和 2-酮基丁酸进行对接，随后将结果导入 PyMOL 进行相互作用的分析[24]，分析结果如图 5 所示。由图 5(a)可知，AHAS 的 Gln157 在没有突变之前虽然与底物丙酮酸结合位点比较相近，但是与丙酮酸没有直接的相互作用。然而突变体 $AHAS^{Gln157Arg}$ 的氨基酸残基 Arg157 与底物丙酮酸之间多了一个氢键(见图 5(b))，氢键对于蛋白质与小分子配体之间起着十分关键的作用，这使得丙酮酸与 AHAS 之间结合更加稳定，增加了底物亲和性，这可能是突变提高酶活力的重要原因。其次，157 位氨基酸从 Gln 突变为 Arg 后氨基酸残基的侧链变大，这个改变可能会缩小底物结合口袋，而丙酮酸体积本身就比较小，缩小的口袋就会更契合丙酮酸，推测这也是突变体酶活力提高的原因之一。

表 3　野生型和突变体酶对丙酮酸合成的动力学参数

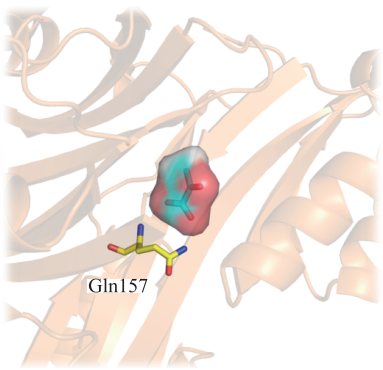
Table 3　Kinetic parameters of wild-type enzyme and mutants to pyruvate

突变体	动力学参数		
	比酶活/(mU/mg)	K_m/(mmol/L)	(K_{cat}/K_m)/(L/(mol·s))
$AHAS^{WT}$	72±4	5.2±0.2	3.2×10^{2}
$AHAS^{Ser38Thr}$	81±5	4.5±0.5	5.1×10^{3}
$AHAS^{Arg138Lys}$	60±2	8.2±0.5	2.6×10^{-1}
$AHAS^{Gln154Lys}$	75±4	5.2±0.4	3.5×10^{2}
$AHAS^{Gln157Arg}$	97±5	2.5±0.2	2.5×10^{4}
$AHAS^{Ser38Thr/Arg138Lys}$	37±3	55.4±3.1	1.6×10^{-2}
$AHAS^{Ser38Thr/Gln154Lys}$	89±3	3.4±0.3	4.2×10^{3}
$AHAS^{Ser38Thr/Gln157Arg}$	55±4	7.3±0.5	3.3×10^{-1}
$AHAS^{Arg138Lys/Gln154Lys}$	51±5	37.4±2.7	4.8
$AHAS^{Arg138Lys/Gln157Arg}$	85±5	3.7±0.2	8.2×10^{3}
$AHAS^{Gln154Lys/Gln157Arg}$	65±4	5.5±0.4	37

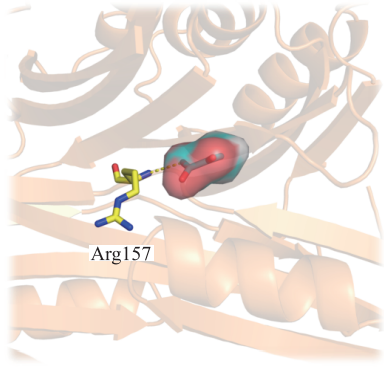
此外，分析了 $AHAS^{WT}$ 和 $AHAS^{Gln157Arg}$ 与底物 2-酮基丁酸的结合情况。如图 5(c)所示，$AHAS^{WT}$ 与底物 2-酮基丁酸之间形成了 3 个氢键，氨基酸结合位点分别是 Ser38、Gln157 以及 Arg138。当 157 位氨基酸从 Gln 突变为 Arg 后，突变体 $AHAS^{Gln157Arg}$ 的 157 位氨基酸残基失去了与 2-酮基丁酸的氢键作用(见图 5(d))，这可能会减弱突变体对 2-酮基丁酸的亲和力，改变其对底物丙酮酸和 2-酮基丁酸的偏好性，从而使更多的碳通量流向 *L*-亮氨酸合成途径，减少副产物 *L*-异亮氨酸的积累。

2.4　重组菌株的产量测定

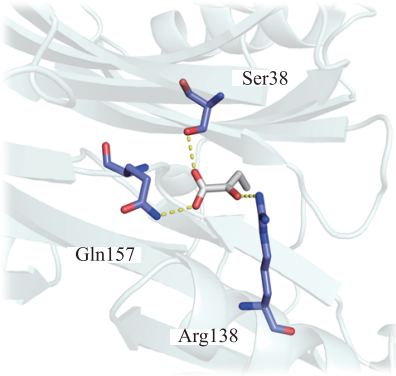
选择了最优突变体 $AHAS^{Gln157Arg}$，使用谷氨酸棒杆菌双交换同源重组策略将突变位点引入到基因组，菌株构建过程参考 1.6 部分。通过测序验证获得重组菌株 *C. glutamicum* XL-3-$ilvBN^{Gln157Arg}$（*C. glutamicum* XL-3-1）。将获得的重组菌株 *C. glutamicum* XL-3-1 摇瓶发酵结果进行测定，结



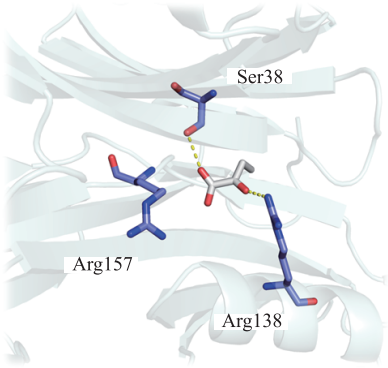
（a）AHAS^{WT}与丙酮酸分子对接结果



（b）突变体AHAS^{Gln157Arg}与丙酮酸分子对接结果



（c）AHAS^{WT}与2-酮基丁酸分子对接结果

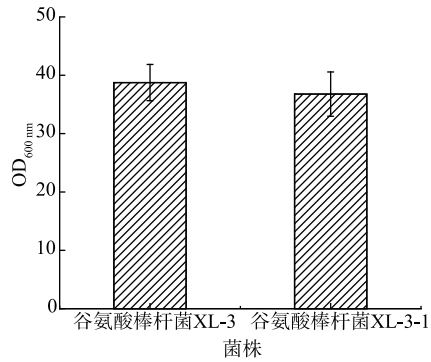


（d）突变体AHAS^{Gln157Arg}与2-酮基丁酸分子对接结果

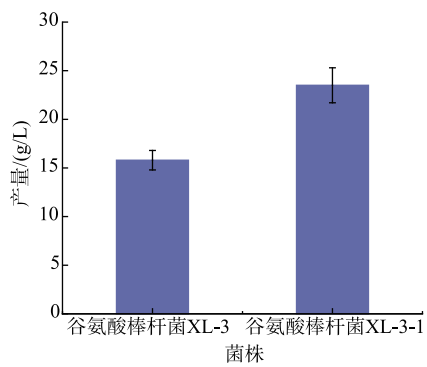
图 5　突变前后蛋白质与底物之间的相互作用

Fig. 5　Interaction between protein and substrate before and after mutation

果如图 6 所示。从图中可以得出重组菌株 *C. glutamicum* XL-3-1 与出发菌株的生长情况相近，说明引入的突变并未对菌株的生长造成影响，其 *L*-亮氨酸产量达到了(23.5±1.8) g/L，与出发菌株相比产量提高了 51%；副产物 *L*-缬氨酸产量为(4.7±0.7) g/L，与出发菌株相比产量提高了 18%；副产物 *L*-异亮氨酸产量为(1.2±0.3) g/L，与出发菌株相比产量下降了 45%。从产量结果表明，将 AHAS 的 Gln157 位点突变成 Arg 能够有效提高 AHAS 催化丙酮酸的能力，减弱其对2-酮基丁酸的亲和力，实现了 AHAS 底物偏好性的改变，在提高 *L*-亮氨酸产量的同时减少了副产物 *L*-异亮氨酸的积累。



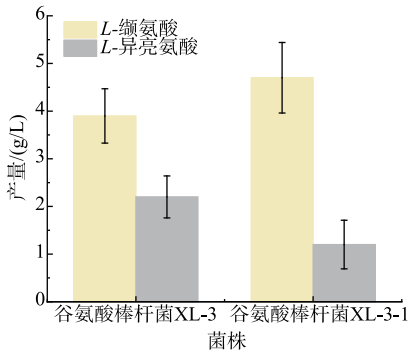
（a）重组菌株$OD_{600\ nm}$



（b）重组菌株*L*-亮氨酸产量

3 结　语

目前关于支链氨基酸主要集中在蛋白质水平上解除支链氨基酸对 AHAS 的反馈抑制以及改造代谢途径减少副产物来实现支链氨基酸的积累[25-26]。然而，关于通过蛋白质改造改变 AHAS 的底物偏好性增加支链氨基酸积累的研究较少。本研究中围绕



（c）重组菌株副产物产量

图 6　摇瓶发酵产物分析

Fig. 6　Analysis of shake flask fermentation products

谷氨酸棒杆菌中 AHAS 的调节亚基进行定点突变，提高了酶催化底物丙酮酸的活性，从而提高丙酮酸流向 *L*-亮氨酸的代谢通量。首先通过同源建模得到了小亚基的蛋白质结构，然后利用 Schordinger 通过分子对接找到 AHAS 与丙酮酸底物结合位点 4 Å 范围内的 7 个氨基酸残基，分别为 Ser38、Ile92、Pro134、Arg138、Gln154、Ser155 和 Gln157，之后通过丙氨酸扫描确定了 4 个重要的氨基酸残基(Ser38、Arg138、Gln154 和 Gln157)。通过测定单突变体 $AHAS^{Ser38Thr}$、$AHAS^{Arg138Lys}$、$AHAS^{Gln154Lys}$、$AHAS^{Gln157Arg}$ 以及双突变体 $AHAS^{Ser38Thr/Arg138Lys}$、$AHAS^{Ser38Thr/Gln154Lys}$、$AHAS^{Ser38Thr/Gln157Arg}$、$AHAS^{Arg138Lys/Gln154Lys}$、$AHAS^{Arg138Lys/Gln157Arg}$、$AHAS^{Gln154Lys/Gln157Arg}$ 酶活力，发现单突变 $AHAS^{Gln157Arg}$ 的酶活力最高，比 $AHAS^{WT}$ 提高了 41%。通过软件分析可知，酶活力提高可能在于底物与酶结合更稳定或者底物口袋缩小增加了底物亲和性。最后将最优突变体 $AHAS^{Gln157Arg}$ 引入，获得重组菌株谷氨酸棒杆菌 XL-3-1。对重组菌株进行摇瓶发酵可知，*L*-亮氨酸产量为(23.5±1.8) g/L，与出发菌株相比产量提高了 51%。本研究为 AHAS 蛋白质改造促进 *L*-亮氨酸的生物合成提供了一种新的思路。

参考文献：

[1] 谭海，顾阳，卢南巡，等. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌促进 *L*-异亮氨酸发酵合成的研究进展[J]. 中国酿造，2021，40(9)：1-6.
TAN H，GU Y，LU N X，et al. Advances in of modifying *Corynebacterium glutamicum* to promote *L*-isoleucine fermentation synthesis by metabolic engineering[J]. **China Brewing**，2021，40(9)：1-6. (in Chinese)

[2] 陈诚. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产*L*- 缬氨酸[D]. 无锡：江南大学，2015.

[3] PLATELL C，KONG S E. Branched-chain amino acids[J]. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**，2000，15(7)：706-717.

[4] 张伟国，程功. 微生物发酵法生产 *L*- 亮氨酸的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2015，34(2)：113-120.
ZHANG W G，CHENG G. Progress on microbial fermentation production of *L*-leucine [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2015，34(2)：113-120. (in Chinese)

[5] WANG X Y，ZHANG H L，QUINN P J. Production of *L*-valine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2018，102(10)：4319-4330.

[6] 马文渐. 改造谷氨酸棒杆菌生产 *L*- 异亮氨酸及 PHA[D]. 无锡：江南大学，2018.

[7] WANG Y Y，SHI K，CHEN P D，et al. Rational modification of the carbon metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to enhance *L*-leucine production[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**，2020，47(6/7)：485-495.

[8] 赵跃芳. 乙酰羟酸合成酶亚基间相互作用的研究[D]. 天津：南开大学，2013.

[9] 崔毅. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产 *L*- 亮氨酸[D]. 天津：天津科技大学，2019.

[10] BANSAL A，KARANTH N M，DEMELER B，et al. Crystallographic structures of IlvN·Val/Ile complexes：conformational selectivity for feedback inhibition of aceto hydroxy acid synthases[J]. **Biochemistry**，2019，58(15)：1992-2008.

[11] GUO Y F，HAN M，YAN W L，et al. Generation of branched-chain amino acids resistant *Corynebacterium glutamicum* acetohydroxy acid synthase by site-directed mutagenesis[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**，2014，19(3)：456-467.

[12] ZHANG Y C，LIU Y D，ZHANG S Y，et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve *L*-isoleucine production[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**，2020，68(3)：568-584.

[13] HASEGAWA S，UEMATSU K，NATSUMA Y，et al. Improvement of the redox balance increases *L*-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions[J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2012，78

(3)：865-875.

[14] LU J N，BRIGHAM C J，PLASSMEIER J K，et al. Characterization and modification of enzymes in the 2-ketoisovalerate biosynthesis pathway of *Ralstonia eutropha* H16[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2015，99(2)：761-774.

[15] HOU X H，GE X Y，WU D，et al. Improvement of *L*-valine production at high temperature in *Brevibacterium flavum* by overexpressing *ilvEBN*^{r}*C* genes[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**，2012，39(1)：63-72.

[16] 陈宁，孙鹏杰，李澜潇，等. 改变中心碳代谢途径对发酵生产 *L*- 亮氨酸的影响[J]. 天津科技大学学报，2021，36(6)：1-7.
CHEN N，SUN P J，LI L X，et al. Effect of rewiring central carbon metabolism on the *L*-leucine production by fermentation[J]. **Journal of Tianjin University of Science & Technology**，2021，36(6)：1-7. (in Chinese)

[17] 王颖妤. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌发酵生产 *L*- 亮氨酸[D]. 无锡：江南大学，2020.

[18] 曾邦定，黄钦耿，梁玲，等. 黄色短杆菌 *ilvN* 基因定点突变和 *ilvBN*、*ilvC* 串联表达对 *L*- 缬氨酸产量的影响[J]. 化工学报，2016，67(7)：2956-2962.
ZENG B D，HUANG Q G，LIANG L，et al. Effects of *Brevibacterium flavum* with directed mutagenesis of *ilvN* and co-expression of *ilvBNC* cluster on *L*-valine production[J]. **CIESC Journal**，2016，67(7)：2956-2962. (in Chinese)

[19] 徐建中，刘洁，王颖妤，等. 丙酮酸和乙酰 -CoA 协同促进 *L*- 亮氨酸的合成[J]. 微生物学报，2021，61(9)：2891-2906.
XU J Z，LIU J，WANG Y Y，et al. Pyruvate works synergistically with acetyl-CoA to boost *L*-leucine production[J]. **Acta Microbiologica Sinica**，2021，61(9)：2891-2906. (in Chinese)

[20] XU J Z，ZHANG W G，HAN M，et al. Modification of aspartokinase III and dihydrodipicolinate synthetase increases the production of *L*-lysine in *Escherichia coli*[J]. **Biochemical Engineering Journal**，2016，114：79-86.

[21] VAN DER REST E，LANGE C，MOLENAAR D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，1999，52(4)：541-545.

[22] 王阳，张玉锋，王昭. 高效液相(HPLC)检测 5 种氨基酸在酮酸制备过程中的应用[J]. 中国高新科技，2021(5)：125-126.
WANG Y，ZHANG Y F，WANG Z. Application of high performance liquid chromatography (HPLC) in determination of five amino acids in preparation of ketoacid[J]. **China High and New Technology**，2021(5)：125-126. (in Chinese)

[23] 徐建中. 基于代谢工程选育谷氨酸棒杆菌 *L*- 赖氨酸高产菌[D]. 无锡：江南大学，2014.

[24] HAGELUEKEN G，WARD R，NAISMITH J H，et al. MtsslWizard：*in silico* spin-labeling and generation of distance distributions in PyMOL[J]. **Applied Magnetic Resonance**，2012，42(3)：377-391.

[25] LIU Y D，WANG X Y，ZHAN J，et al. The 138th residue of acetohydroxyacid synthase in *Corynebacterium glutamicum* is important for the substrate binding specificity[J]. **Enzyme and Microbial Technology**，2019，129：109357.

[26] WANG Y Y，XU J Z，JIN Z Y，et al. Improvement of acetyl-CoA supply and glucose utilization increases *L*-leucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Biotechnology Journal**，2022，17(8)：2100349.