DOI:10.12441/spyswjs.20241028001 [文章编号] 1673-1689(2025)12-0156-09

重组大肠杆菌高效催化合成5-甲基吡嗪-2-羧酸

甘露茜 宫 衡*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

摘要:【目的】通过生物催化法提高5-甲基吡嗪-2-羧酸(5-methylpyrazine-2-carboxylic acid,MPCA)的产量和转化率。**【方法】**以大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)为模式生物构建MPCA合成体系,优化重组大肠杆菌的全细胞催化反应条件。通过紫外诱变技术对亲本宿主菌株进行诱变,筛选耐受高质量浓度2,5-二甲基吡嗪(dimethylpyrazine,DMP)的宿主菌株。**【结果】**重组诱变菌株在10 mL反应体系中可将10 g/L DMP在12 h内完全转化为MPCA,产量达12.9 g/L,摩尔转化率为100%;YB-CMAB全细胞催化剂循环利用3次耗时18 h,MPCA总产量达20.6 g/L,平均摩尔转化率为89%。**【结论】**该研究构建了一种高效、高转化率的全细胞催化合成MPCA的菌株,为MPCA的工业化生产提供了技术支撑。

关键词:5-甲基吡嗪-2-羧酸;紫外诱变;异源表达;全细胞催化

Efficient Catalytic Synthesis of 5-Methylpyrazine-2-carboxylic Acid by Recombinant *Escherichia coli*

*GAN Luxi GONG Heng**

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to improve the yield and conversion rate of 5-methylpyrazine-2-carboxylic acid (MPCA) through biocatalysis. [**Method**] *Escherichia coli* (*E. coli*) was used as the model organism to construct an MPCA synthesis system, and the whole-cell catalytic reaction conditions of recombinant *E. coli* were optimized. In addition, the parental host strain was subjected to ultraviolet mutagenesis for the screening of host strains tolerant to high mass concentrations of 2, 5-dimethylpyrazine (DMP). [**Result**] The recombinant mutagenized strain could completely convert 10 g/L DMP to MPCA within 12 h in a 10 mL reaction system, achieving a yield of 12.9 g/L and a corresponding molar conversion rate of 100%. The whole-cell catalyst YB-CMAB was recycled three times for 18 h, with a total MPCA yield of 20.6 g/L and an average molar conversion rate of 89%. [**Conclusion**] This study established an efficient whole-cell catalytic strain with a high conversion rate for MPCA synthesis, providing technical support for the industrial production of MPCA.

Keywords: 5-methylpyrazine-2-carboxylic acid; ultraviolet mutagenesis; heterologous expression; whole-cell catalysis

MPCA是一种重要的医药中间体,在多种药物的合成过程中发挥着不可或缺的作用。它是第二代磺脲类口服降血糖药格列吡嗪[1]和新一代长效降血脂药阿昔莫司合成中不可或缺的原料[2],并在治疗结核病的有效药2-甲基吡嗪-5-羧酸甲酯[3-5]的合成中起着重要作用。目前,MPCA的合成方法较多,主要分为化学合成法[6-9]、电化学合成法[10-11]及生物合成法。其中化学合成法与电化学合成法存在污染环境、能耗高及成本高等问题,而生物合成法因具有绿色环保、成本低、效率高等优势,近年来备受研究者关注。

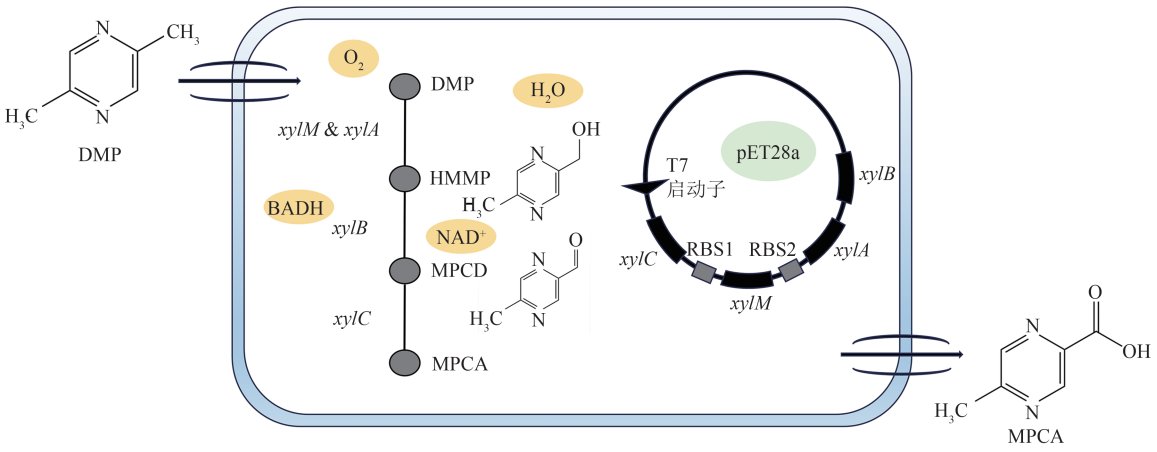
生物法合成MPCA的报道最早见于1992年,

通信作者:宫衡(1967—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物发酵工程研究。E-mail:gongheng@ecust.edu.cn

收稿日期:2024-10-28 **修回日期:**2024-12-21

Kiener[12]利用野生型 *P. putida* ATCC33015 进行全细胞催化，采用体积分数 75% 的对二甲苯和体积分数 25% 的 DMP 为底物培养细胞 54 h，最终获得 MPCA 产量达 20 g/L。后续研究明确了野生型 *P. putida* ATCC33015 生物合成 MPCA 的路径：首先在 *xylM* 和 *xylA* 编码基因的 2 个亚基组成的二甲苯单加氧酶（XMO）催化下[13-14]，起始底物 DMP 氧化生成 5-甲基吡嗪-2-甲醇（HMMP）；HMMP 在 *xylB* 基因编码的苯甲醇脱氢酶（BADH）作用下，以 NAD^+ 为辅因子脱氢生成 5-甲基吡嗪-2-甲醛（MPCD）[15]；最后，MPCD 在 *xylC* 基因编码的苯甲醛脱氢酶（BZDH）作用下，以 NAD^+ 为辅因子进一步脱氢并生成目标产物 MPCA[16-17]，见图 1。已有研究者基于该合成路径采用酶催化法合成 MPCA，但该催化法需体外分离纯化酶，且需外源添加辅因子[18]。相比之下，全细胞催化法无需破碎细胞，可直接利用细胞内固有的辅因子完成转化过程，不仅降低了催化剂制备成本，还能显著提高催化效率[19]。因此，越来越多的研究者致力于筛选野生型菌株用于 MPCA 的全细胞合成，但野生型菌株普遍存在培养周期长、目标蛋白质表达量低、培养条件苛刻、遗传背景模糊及工程改造难度大等问题，导致 MPCA 的合成效率与转化率均较低，难以满足工业化生产需求，因此建立高效催化合成 MPCA 的方法迫在眉睫。

作者以 *E. coli* 为模式生物构建 MPCA 合成体系，通过在 *E. coli* 中表达 *P. putida* ATCC33015 的 MPCA 合成途径，优化重组 *E. coli* 的全细胞催化反应条件；同时结合紫外诱变技术对亲本宿主菌株进行诱变处理，以筛选耐受高质量浓度 DMP 的突变菌株，为生物合成 MPCA 的工业化生产提供新思路。



RBS1—核糖体结合位点 1；RBS2—核糖体结合位点 2。

图 1　重组 *E. coli* 利用底物 DMP 合成 MPCA 的示意图

Fig. 1　Synthetic diagram of MPCA in recombinant *E. coli* with DMP as the substrate

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株和质粒

菌株 *E. coli* BL21（DE3）、*P. putida* ATCC33015、*E. coli* DH5α、质粒 pET28a：作者所在实验室保藏；重组质粒 pET28a-*xylC*-*xylM*-*xylA*-*xylB*：作者所在实验室构建。

1.1.2　酶和试剂

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、限制性内切酶：天根生物科技（北京）有限公司；同源重组试剂盒：北京全式金生物技术有限公司；其他试剂：均为国产分析纯。

1.1.3　培养基

LB 培养基（g/L）：胰蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，NaCl 10.0，琼脂粉 15.0。

TB 培养基（g/L）：胰蛋白胨 12.0，酵母提取物 24.0，甘油 5.0，磷酸二氢钾 2.3，三水磷酸氢二钾 6.4。

1.2　方法

1.2.1　重组菌株的构建

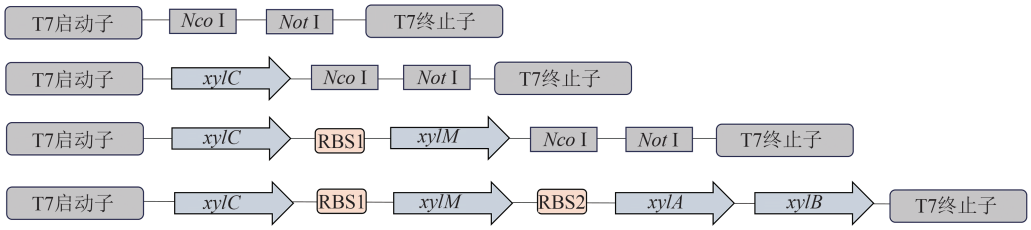
以 *P. putida* ATCC33015 基因组 DNA 为模板，采用 PCR 扩增 *xylC*、*xylM*、*xylA* 和 *xylB* 基因，所用

引物序列见表1。以pET28a为表达载体，采用限制性内切酶*Not* I和*Nco* I分别对载体与目的基因克隆片段进行双酶切，构建重组质粒pET28a-*xylC-xylM-xylA-xylB*，构建流程见图2。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列（5′—3′）
C-F1	TAAGAAGGAGATATACCATGATGCGGGAAACAAAAGA
C-R1	GGTGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCACTAGGACCATGGCTCAAAATGGGTAATTAGCT
M-F2	TTACCCATTTTGAGCCATGTCTATTAAAAGAGGTTGAAATGGACACGCTTCGTTATT
M-R2	TGGTGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCACTAGGACCATGGTCAAATGCTAGCCACCCGAC
AB-F3	GGGTGGCTAGCATTTGACCATGATATTTGAAGGAATTCTTTATGAATGAGTTTTTTAAG
AB-R3	GTGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCTCAACCAATCCGGAGTA



RBS1—核糖体结合位点1；RBS2—核糖体结合位点2。

图2 重组质粒pET28a-*xylC-xylM-xylA-xylB*的构建流程

Fig. 2 Construction process of the recombinant vector pET28a-*xylC-xylM-xylA-xylB*

1.2.2 重组菌株的培养及诱导表达

将重组质粒pET28a-*xylC-xylM-xylA-xylB*转化至*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞中，获得重组菌株*E. coli*-CMAB。挑取单菌落接种于LB培养基，于37 ℃、220 r/min振荡培养12 h进行活化；随后以1%的接种体积分数转接至TB培养基，于37 ℃培养至OD_{600}值为0.6~0.8，加入诱导剂IPTG，于20 ℃、220 r/min诱导表达20 h。诱导培养结束后离心收集菌体，用PBS缓冲液（pH 7.0）洗涤菌体并重悬。取适量菌悬液与SDS上样缓冲液混匀，沸水浴5 min，离心后取10 μL上清液进行SDS-PAGE分析。

1.2.3 全细胞催化合成MPCA

离心诱导表达完成的重组菌株，弃去上清液，用磷酸钾盐缓冲液（0.1 mol/L、pH 7.0）洗涤2~3次，再次离心收集沉淀，即为全细胞催化剂。将收集的菌体用磷酸钾盐缓冲液（0.1 mol/L、pH 7.0）重悬，加入终质量浓度为5 g/L的DMP，构建总体积为10 mL的催化反应体系。采用高效液相色谱仪测定发酵液中MPCA质量浓度。

1.2.4 全细胞催化合成MPCA的条件优化

以MPCA质量浓度和MPCA转化率为评价指标，分别考察催化时间（0~15 h）、pH（6.0、7.0、8.0）、DMP质量浓度（4、6、8、10 g/L）、金属离子（Zn^{2+}、Fe^{3+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Mg^{2+}）对重组菌株*E. coli*-CMAB全细胞催化合成MPCA的影响。

1.2.5 检测方法

采用紫外分光光度计测定菌悬液OD_{600}值；采用高效液相色谱仪测定反应液中DMP、MPCA质量浓度。色谱条件为：色谱柱为WondaCract ODS色谱柱（250 mm×4.6 mm×5.0 μm），流动相为*V*（乙腈）∶*V*（水）=4.5∶95.5，流量0.8 mL/min，柱温25 ℃。MPCA摩尔转化率按式（1）计算。

$$\alpha=\frac{C_M\times 108.14}{C_D\times 138.12}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

α——MPCA摩尔转化率，%；

C_M——MPCA质量浓度，g/L；

C_D——DMP质量浓度，g/L；

138.12——MPCA摩尔质量，g/mol；

108.14——DMP摩尔质量，g/mol。

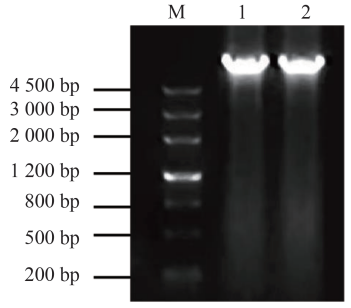
1.2.6　紫外诱变与菌体富集筛选

菌株活化后接种至LB液体培养基中，于37 ℃培养12 h，取适量菌液转移至平皿，于紫外诱变箱进行诱变处理。采用紫外诱变箱照射时，选择菌体致死率达90%的照射时间（120 s）。将诱变处理后的菌悬液转移至含有DMP的摇瓶培养基，于37 ℃、220 r/min避光培养12 h。第一代培养结束后，接种至新的含有DMP的摇瓶培养基中进行富集培养，累计传代20代，每代培养结束后测定菌悬液OD_{600}值。将最终富集后的菌悬液梯度稀释后涂布至LB固体培养基，挑取单菌落接种至含DMP培养基的96孔板中，37 ℃摇床振荡培养12 h，用酶标仪测定菌悬液OD_{600}值。根据测定结果，筛选OD_{600}值最高的单菌落进行保种。经诱变、富集及筛选获得的诱变菌株，简称YB。

2　结果与讨论

2.1　重组菌株的构建与表达结果

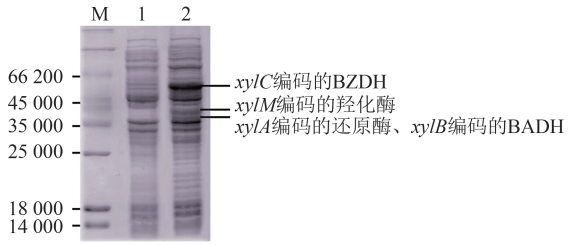
按照1.2.1中的方法成功构建重组质粒pET28a-*xylC*-*xylM*-*xylA*-*xylB*，将其转化至*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞中，获得重组菌株*E. coli*-CMAB。以引物C-F1和AB-R3对阳性单克隆菌落进行PCR验证，结果见图3。结果表明，阳性单克隆电泳条带与目的条带（5 016 bp）大小接近。经IPTG诱导后，重组菌株*E. coli*-CMAB成功表达相应蛋白质，SDS-PAGE结果见图4。与*E. coli*-pET28a空载菌株相比，重组菌株*E. coli*-CMAB出现明显条带。其中*xylC*基因编码的蛋白质相对分子质量为51 000，*xylM*基因编码的蛋白质相对分子质量为41 000，*xylA*基因编码的蛋白质相对分子质量为38 000，*xylB*基因编码的蛋白质相对分子质量为38 000[20]。



M—DNA Marker；1~2—重组菌株目的基因。

图3　pET28a-*xylC*-*xylM*-*xylA*-*xylB*的PCR验证结果

Fig. 3　PCR identification results of pET28a-*xylC*-*xylM*-*xylA*-*xylB*



M—蛋白质Marker；1—*E. coli*-pET28a空载菌株；2—*E. coli*-CMAB。

图4　重组菌株*E. coli*-CMAB的蛋白质表达结果

Fig. 4　Protein expression results of the recombinant strain *E. coli*-CMAB

2.2　全细胞催化合成MPCA的条件优化结果

2.2.1　反应时间优化结果

在实际应用中，为保证一定的生产效率，需要将反应时间控制在合适范围内。作者对全细胞催化过程进行了15 h的连续取样，测定重组菌株*E. coli*-CMAB催化DMP转化为MPCA的摩尔转化率，见图5。结果表明，反应3 h后，转化率显著提升；反应6 h后，转化率趋于稳定。重组菌株*E. coli*-CMAB能将4 g/L的DMP完全转化为MPCA，摩尔转化率达100%。

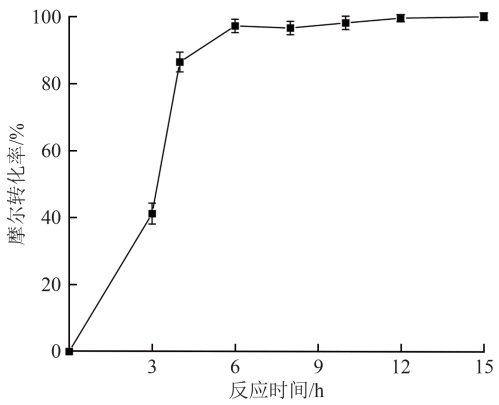


图5　反应时间对全细胞催化合成MPCA摩尔转化率的影响

Fig. 5　Effect of reaction time on the molar conversion rate of whole-cell catalytic product MPCA

2.2.2　pH优化结果

在催化反应体系中，pH会通过影响菌体状态和酶促反应效率来影响MPCA摩尔转化率[21]。因此，作者考察了全细胞催化体系中不同初始pH（6.0、7.0、8.0）对催化合成MPCA的影响，见图6。结果表明，当反应体系pH为7.0或8.0时，4 g/L的

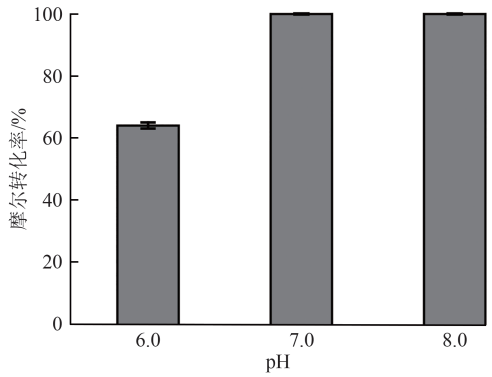


图 6　pH 对全细胞催化合成 MPCA 摩尔转化率的影响

Fig. 6　Effect of pH on the molar conversion rate of whole-cell catalytic product MPCA

DMP 均可被 *E. coli*-CMAB 完全转化为 MPCA，摩尔转化率达 100%，表明中性和偏碱性环境更有利于该重组菌株发挥催化作用。鉴于 MPCA 呈酸性会导致反应过程中缓冲液 pH 下降，后续试验的反应 pH 设定为 8.0。

2.2.3　底物质量浓度优化结果

在酶催化反应中，底物质量浓度会影响酶促反应速率，底物质量浓度高虽可增加酶与底物的碰撞，在一定程度上促进反应的进行，但底物质量浓度过高易引发资源低效利用的问题[22]。作者探究了不同底物质量浓度对全细胞催化合成 MPCA 摩尔转化率和产量的影响，见图 7（a）。全细胞催化反应 6 h 后，重组菌株 *E. coli*-CMAB 可将 6 g/L 的 DMP 完全催化，产物 MPCA 产量为 7.7 g/L。当 DMP 质量浓度提高至 8 g/L 和 10 g/L 时，MPCA 产量分别为 7.8 g/L 和 7.6 g/L，这表明全细胞催化反应受到抑制。对反应结束后的发酵液进行 pH 检测，结果显示，发酵液的 pH 均接近 6.5，与初始反应 pH（8.0）相差较大。推测是由于产物 MPCA 酸性较强，破坏了反应体系的 pH 平衡，从而导致反应无法继续进行。作者配制了质量浓度为 3.0 g/L 的 MPCA 溶液，测得其 pH 仅为 3.0，证实了 MPCA 酸性较强。将上述反应体系的 pH 调至 8.0，再次反应 6 h，结果见图 7（b）。8 g/L 的 DMP 可完全转化为 MPCA，MPCA 产量为 10.3 g/L；10 g/L 的 DMP 生成 MPCA 的产量为 11.8 g/L，摩尔转化率为 92%。

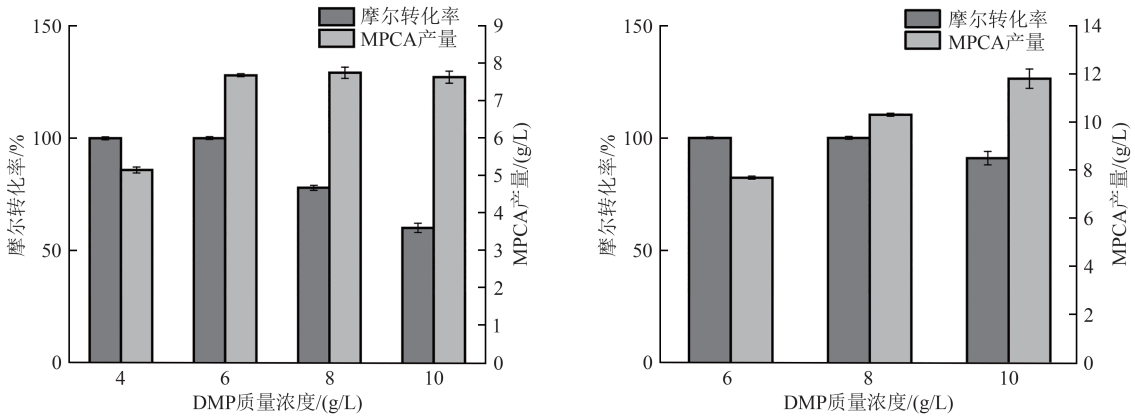


图 7　DMP 质量浓度对全细胞催化合成 MPCA 摩尔转化率和产量的影响

Fig. 7　Effects of DMP mass concentration on the molar conversion rate and yield of whole-cell catalytic product MPCA

2.2.4　金属离子优化结果

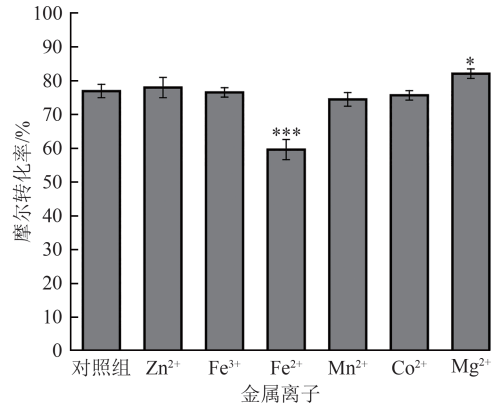
金属离子会影响某些酶的构象，进而影响底物与酶的结合能力[23]，因此金属离子可能是影响全细胞催化反应效率的因素之一。作者以 MPCA 摩尔转化率为评价指标，考察不同金属离子对催化反应的影响。设定 DMP 质量浓度为 8 g/L，向反应体系中分别添加 3×10^{-3} mol/L 的金属离子（Zn^{2+}、Fe^{3+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Mg^{2+}），反应时间为 6 h，结果见图 8。Fe^{2+} 对 MPCA 的合成具有极其显著的抑制作用（$P<0.001$），Mg^{2+} 可显著促进反应的进行（$P<0.05$），而 Zn^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+}、Co^{2+} 对反应无显著影响，这表明 *P. putida* ATCC33015 来源的酶不是金属离子依赖型酶。

2.3　紫外诱变育种结果

2.3.1　野生型菌株 *E. coli* BL21（DE3）的底物耐受性评价

由 2.2.3 结果可知，随着底物 DMP 质量浓度的

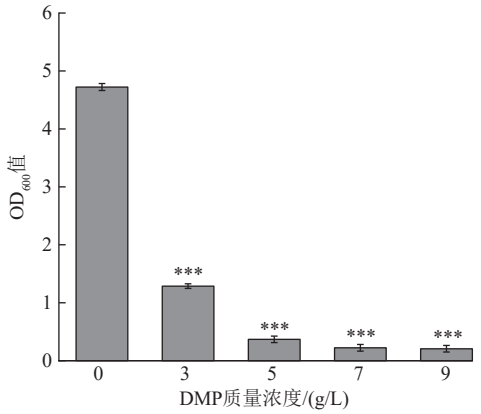
升高，产物MPCA的摩尔转化率提升有限，据此推测底物DMP会抑制菌株的生长，因此采用紫外诱变育种的方法筛选耐受高质量浓度DMP的菌株。如图9所示，底物DMP会抑制菌株的生长，且质量浓度越高，抑制作用越强。为了筛选出耐受高质量浓度DMP的菌株，选择质量浓度为5 g/L的DMP用于后续试验。



与对照组相比，*—P<0.05，***—P<0.001。

图8　金属离子对全细胞催化合成MPCA摩尔转化率的影响

Fig. 8　Effects of metal ions on the molar conversion rate of whole-cell catalytic product MPCA



与DMP质量浓度为0 g/L组相比，***—P<0.001。

图9　DMP质量浓度对*E. coli* BL21(DE3)的影响

Fig. 9　Effect of DMP mass concentration on *E. coli* BL21(DE3)

2.3.2　突变菌株的富集培养

OD_{600}值是反映菌株生长密度的重要指标，其数值越高，表明菌株生长状态越好。诱变菌株OD_{600}值随传代次数的变化见图10，OD_{600}值随传代次数的增加呈上升趋势。传代完成后，将菌悬液稀释、分离并涂布在平板上得到单菌落，随机挑选30个经诱变传代富集的单菌落和30个未诱变单菌落，接种至含5 g/L DMP培养基的96孔板中培养，通过高通量酶标仪测定其OD_{600}值，结果见图11。可以看出，诱变组的OD_{600}值整体高于对照组。表明在驯化过程中，生长缓慢的劣势菌株被逐渐淘汰，优势菌株逐步富集；经诱变、传代及富集培养后，成功获得生长状态良好的诱变菌株，并将其命名为YB。

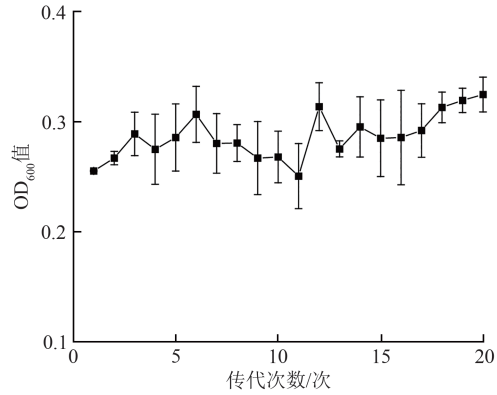
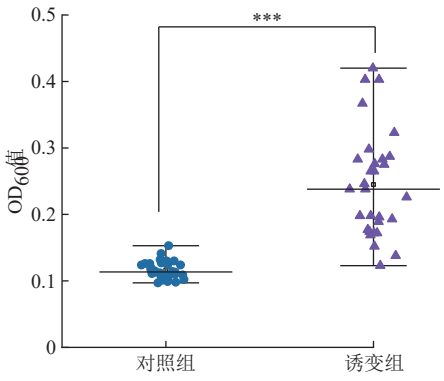


图10　诱变菌株OD_{600}值随传代次数的变化

Fig. 10　Variations in OD_{600} value of mutagenic strain with passages



***—P<0.001。

图11　高通量筛选结果

Fig. 11　High-throughput screening results

2.3.3　诱变菌株YB的底物耐受性评价

将诱变菌株YB与出发菌株*E. coli* BL21(DE3)分别接种于含不同质量浓度DMP的培养基中，分别测量培养6 h和12 h的菌株OD_{600}值，见图12。在含不同质量浓度DMP(5、6、7、8 g/L)的培养基中，诱变菌株YB的OD_{600}值均高于出发菌株*E. coli* BL21(DE3)，且对高质量浓度DMP表现出更佳的耐受性。这些结果表明，诱变菌株YB在高质量浓度的DMP中能更好地维持生长与代谢活性，具有更强的环境适应能力，符合筛选预期。

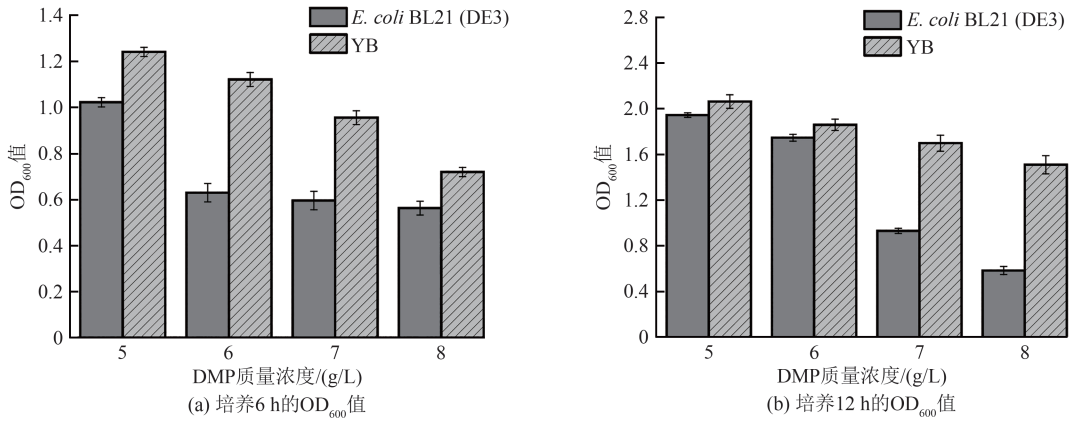


图 12　DMP 质量浓度对 YB 和 *E. coli* BL21(DE3)的影响

Fig. 12　Effects of DMP mass concentration on YB and *E. coli* BL21(DE3)

2.3.4　重组菌株 YB-CMAB 全细胞催化合成 MPCA 结果

将重组质粒 pET28a-*xylC-xylM-xylA-xylB* 转入诱变菌株 YB 中，获得重组菌株 YB-CMAB。分别以 YB-CMAB 和 *E. coli*-CMAB 为出发菌株，按照 1.2.3 所述方法制备全细胞催化剂并开展对比试验，全细胞催化反应体系中底物 DMP 质量浓度分别为 8 g/L 和 10 g/L，并于反应 2、4、6 h 取样检测，结果见图 13。在不同质量浓度底物条件下，YB-CMAB 的催化速率均高于 *E. coli*-CMAB；当 DMP 的初始质量浓度为 8 g/L 时，YB-CMAB 催化合成 MPCA 的最终产量为 7.9 g/L，而 *E. coli*-CMAB 催化合成 MPCA 的最终产量仅为 7.4 g/L；当 DMP 初始质量浓度为 10 g/L 时，YB-CMAB 催化合成 MPCA 的最终产量为 8.0 g/L，而 *E. coli*-CMAB 催化合成 MPCA 的最终产量仅为 7.2 g/L。此外，2 株菌株催化合成 MPCA 的摩尔转化率均未达到 100%。

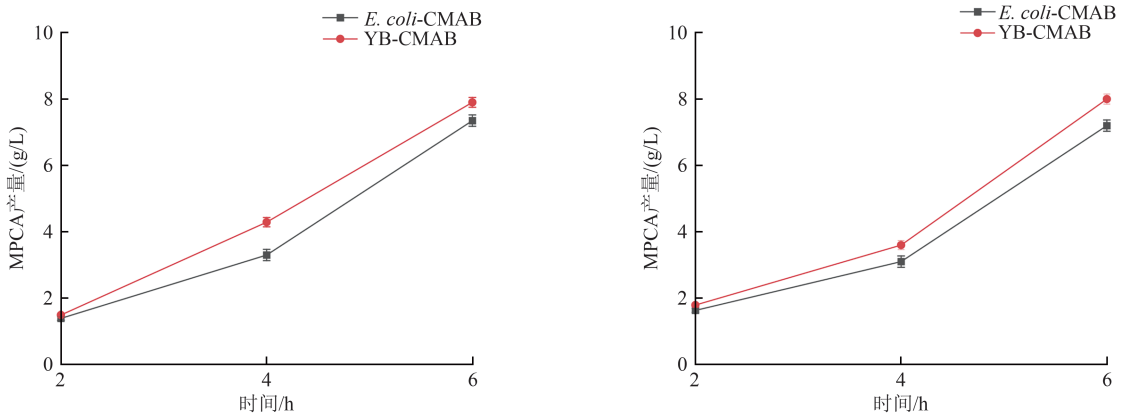


图 13　菌株 YB-CMAB 和 *E. coli*-CMAB 全细胞催化合成 MPCA 的产量

Fig. 13　Yields of MPCA synthesized under the whole-cell catalysis by strains YB-CMAB and *E. coli*-CMAB

全细胞催化反应体系的 pH 会随产物 MPCA 的生成而下降，进而抑制催化反应的持续进行，反应 6 h 后体系的 pH 结果见图 14(a)。YB-CMAB 反应体系的 pH 均略低于 *E. coli*-CMAB，表明在反应 6 h 时 YB-CMAB 的 MPCA 产量略高于 *E. coli*-CMAB，与 MPCA 产量结果一致。将反应体系 pH 调至 8.0 继续反应 6 h，MPCA 摩尔转化率结果见图 14(b)。在 YB-CMAB 反应体系中，10 g/L 的 DMP 被完全转化为 MPCA，产量达 12.9 g/L，摩尔转化率为 100%；而 *E. coli*-CMAB 催化合成的 MPCA 产量为 11.8 g/L，摩尔转化率为 92%。结果表明，与重组菌株 *E. coli*-CMAB 相比，重组菌株 YB-CMAB 具有更强的底物耐受性与更高的 MPCA 合成能力，是一株诱变成功的优良菌株。

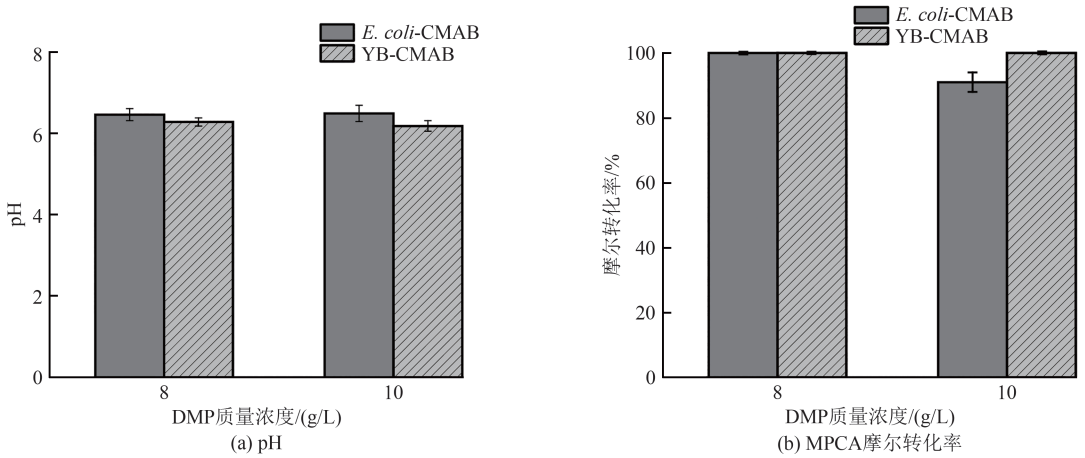


图14　菌株YB-CMAB和*E. coli*-CMAB全细胞催化反应中pH及MPCA摩尔转化率

Fig. 14　pH and molar conversion rate of MPCA in the whole-cell catalytic reactions of strains YB-CMAB and *E. coli*-CMAB

2.3.5　YB-CMAB全细胞催化剂的循环利用

当DMP质量浓度为6 g/L时，可在6 h内完全转化为MPCA；若继续提升DMP质量浓度至8 g/L，酸性产物MPCA会导致反应体系pH下降，进而抑制催化反应进行，因此需将反应体系pH调控至8.0才能实现底物的完全转化。基于此，按1.2.3所述方法制备全细胞催化剂，并添加6 g/L的DMP，反应6 h后离心去除上清液，再次加入等量的pH 8.0的缓冲液和底物，反应6 h完成第2次反应，重复上述操作完成第3次反应，结果见图15。第2次催化反应的MPCA摩尔转化率达94%，第3次催化反应的摩尔转化率达73%。结果表明，该全细胞催化剂具备多次循环利用潜力，经3次循环后，MPCA总产量达20.6 g/L，平均摩尔转化率达89%。该方法在反应过程中无需额外调节pH，仅需更换缓冲液即可实现菌体的重复使用，有效提高了全细胞催化剂的利用率和催化效率。

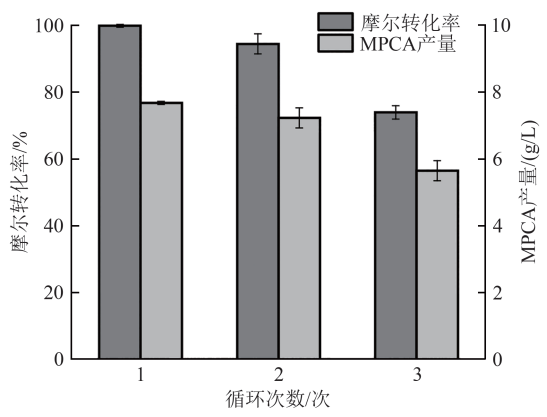


图15　YB-CMAB全细胞催化剂的循环利用结果

Fig. 15　Recycling results of YB-CMAB whole-cell catalyst

3　结论

作者在*E. coli*中异源表达*P. putida*中的二甲苯单加氧酶、苯甲醇脱氢酶和苯甲醛脱氢酶基因，获得重组菌株*E. coli*-CMAB，该菌株可在6 h内将6 g/L的DMP完全转化为MPCA。在对催化反应条件优化过程中发现，pH是全细胞催化反应的关键限制因素，催化过程中酸性产物MPCA的持续生成会导致反应体系pH下降，进而抑制反应的持续进行，因此在生产过程中需及时调控反应体系的pH。高质量浓度DMP对菌株的催化活性存在显著抑制作用；通过紫外诱变技术筛选获得耐受高质量浓度DMP的诱变菌株YB，进一步构建重组菌株YB-CMAB，显著提高了MPCA的产量和摩尔转化率，10 g/L DMP可被完全转化，MPCA产量达12.9 g/L，摩尔转化率为100%。此外，全细胞催化剂具备循环利用潜力，循环利用3次后，MPCA总产量为20.6 g/L，平均摩尔转化率为89%。本研究构建的菌株不仅解决了现有生物合成法转化率低、合成时间长的问题，还实现了MPCA的绿色高效合成，为MPCA的工业化生产提供了依据，具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] SARMA R K，KAMAT P L. Process for the preparation of *N*-[2-[4-(aminosulfonyl) phenyl] ethyl] 5-methylpyrazinecarboxamide：US5516906[P]. 1996-05-14.

[2] 肖月华，沈兆军，王海昕，等. 阿西莫司中间体合成[J]. 齐鲁药事，2005，24(10)：617-617.
XIAO Y H，SHEN Z J，WANG H X，et al. Synthesis of acipimox's intermediates[J]. Qilu Pharmaceutical Affairs，2005，24(10)：617-617.(in Chinese)

[3] 董阳阳. 金属卟啉催化氧气氧化2,5-二甲基吡嗪的研究[D]. 北京:北京工业大学,2013.

[4] HENRY C M. Pyrazinoic acid esters as anti-mycobacterium avium agents:US5643912[P]. 1997-07-01.

[5] CYNAMON M H,GIMI R,GYENES F,et al. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum *in vitro* antimycobacterial activity[J]. Journal of Medicinal Chemistry,1995,38(20):3902-3907.

[6] ITOH A,KODAMA T,HASHIMOTO S,et al. Oxidation of the methyl group at the aromatic nucleus with molecular oxygen in the presence of *N*-bromosuccinimide under photoirradiation[J]. Synthesis,2003(15):2289-2291.

[7] 冯亚青. 用$KMnO_4$一步氧化制备5-甲基吡嗪-2-羧酸的方法:CN1141299C[P]. 2004-03-10.

[8] IOVEL'I G,YANSONE I Y,GOL'DBERG Y S,et al. Oxidation of 2,5-dimethylpyrazine with oxygen in the vapor phase on oxide catalysts and in the liquid phase in the presence of bases[J]. Chemistry of Heterocyclic Compounds,1990,26(4):456-461.

[9] 谢婷,陈文华. 5-甲基吡嗪-2-羧酸的合成[J]. 化学试剂,2011,33(9):849-851.
XIE T,CHEN W H. Synthesis of 5-methylpyrazine-2-carboxylic acid[J]. Chemical Reagents,2011,33(9):849-851.(in Chinese)

[10] FOA M,FORLINI F,GATTI N,et al. Electrochemical synthesis of 2-methyl-5-pyrazinoic acid:US0316945[P]. 1992-02-25.

[11] FELDMAN D,CHERVENKA M,STOKH E,et al. Anodic oxidation of methyl-substituted nitrogen-containing heterocyclic compounds at the[J]. Chemistry of Heterocyclic Compounds,1995,31(1):80-85.

[12] KIENER A. Enzymatic oxidation of methyl groups on aromatic heterocycles: a versatile method for the preparation of heteroaromatic carboxylic acids[J]. Angewandte Chemie International Edition in English,1992,31(6):774-775.

[13] SHAW J P,HARAYAMA S. Characterization *in vitro* of the hydroxylase component of xylene monooxygenase,the first enzyme of the TOL-plasmid-encoded pathway for the mineralization of toluene and xylenes[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering,1995,79(3):195-199.

[14] BRAMUCCI M,SINGH M,NAGARAJAN V. Biotransformation of *p*-xylene and 2,6-dimethylnaphthalene by xylene monooxygenase cloned from a *Sphingomonas* isolate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2002,59(6):679-684.

[15] MARUYAMA T,IIDA H,KAKIDANI H. Oxidation of both termini of *p*-and *m*-xylene by *Escherichia coli* transformed with xylene monooxygenase gene[J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic,2003,21(4/5/6):211-219.

[16] BÜHLER B,SCHMID A,HAUER B,et al. Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols,aldehydes,and acids in *Escherichia coli* JM101[J]. Journal of Biological Chemistry,2000,275(14):10085-10092.

[17] SHAW J P,HARAYAMA S. Purification and characterisation of the NADH: acceptor reductase component of xylene monooxygenase encoded by the TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida* Mt-2[J]. European Journal of Biochemistry,1992,209(1):51-61.

[18] 丰婧,李瑞峰,陈艳春,等. 一种酶法生产5-甲基吡嗪-2-羧酸:CN107312806B[P]. 2017-11-03.

[19] 霍晓静,黄建忠,李力. 全细胞催化技术在制药领域中的应用[J]. 药物生物技术,2019,26(4):352-356.
HUO X J,HUANG J Z,LI L. Application of whole cell catalysis technique in pharmaceutical field[J]. Pharmaceutical Biotechnology,2019,26(4):352-356.(in Chinese)

[20] SHAW J P,REKIK M,SCHWAGER F,et al. Kinetic studies on benzyl alcohol dehydrogenase encoded by TOL plasmid pWWO. A member of the zinc-containing long chain alcohol dehydrogenase family[J]. The Journal of Biological Chemistry,1993,268(15):10842-10850.

[21] 付声亮,邹诗瑶,高娃,等. 重组大肠杆菌全细胞转化苹果酸合成丙酮酸[J]. 中国食品学报,2024,24(7):219-228.
FU S L,ZOU S Y,GAO W,et al. Biosynthesis of pyruvate from malic acid by whole-cell biotransformation using recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2024,24(7):219-228.(in Chinese)

[22] 郑蝶,杨海泉,夏媛媛,等. 重组大肠杆菌全细胞催化法生产*N*-乙酰神经氨酸[J]. 食品与生物技术学报,2024,43(2):38-46.
ZHENG D,YANG H Q,XIA Y Y,et al. Production of *N*-acetylneuraminic acid from fermentation broth using recombinant *Escherichia coli* whole cells biotransformation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2024,43(2):38-46.(in Chinese)

[23] 刘祖怡,乔郅钠,杜宇轩,等. 重组枯草芽孢杆菌全细胞高效催化合成*D*-甘露糖[J]. 生物工程学报,2024,40(9):3158-3170.
LIU Z Y,QIAO Z N,DU Y X,et al. Efficient whole-cell biosynthesis of *D*-mannose by recombinant *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology,2024,40(9):3158-3170.(in Chinese)

(责任编辑:张馨文)