# 摘 要

D-丝氨酸（D-Ser）起到调节人类神经系统的功能，在医药领域，可以作为治疗由感染引起的肺结核病的药物中间体，可以用于治疗可卡因依赖症、精神分裂症。在化妆品领域，D-Ser 可以作为活性物质添加到护肤品中。目前，合成 D-Ser 的主要方法普遍存在着污染环境、产率低等缺点。前期研究已经构建出了一条耦联来源于 *Proteus mirabilis* 的 L-氨基酸脱氨酶（PmirLAAD）、来源于 *Symbiobacterium thermophilum* 的 D-氨基酸脱氢酶（StDAPDH）和来源于 *Burkholderia stabilis* 的甲酸脱氢酶（BsFDH）的多酶级联路线，能够以廉价易得的 L-氨基酸为底物，最终合成 D-氨基酸。然而，上述酶及其多酶体系合成 D-Ser 的产率和光学纯度仍然有限。为了开发可用于高选择性合成 D-Ser 的氨基酸脱氢酶，并构建一条能够高效合成 D-Ser 的多酶级联体系，本研究开展了关键酶的分子改造和多酶体系构建优化研究，具体结果如下：

（1）通过 D-Ser 合成关键功能酶的催化活性表征，确定了该多酶级联路线各模块所需要的模块酶，并对各模块的催化特性进行了考察，其中 PmirLAAD 的最适温度为 42°C，在温度>50°C 时活性明显下降。当 pH>7 时，PmirLAAD 的催化活性一直处于较高状态，但是当 pH<7 时，活性则明显下降，因此 PmirLAAD 适合在碱性条件下进行催化，且受到 pH 的影响较小。StDAPDH/H227V 的最适 pH 为 9.5，催化活性在 35-50°C 之间受到温度的影响较小，相对酶活较高。PmirLAAD 和 StDAPDH/H227V 催化的反应均无逆反应发生。BsFDH 在 pH 7.0-10.5 的碱性环境下催化活性随着 pH 的升高稍有下降，但变化不明显，一直处于较高的催化活性。在 25-50°C 内，BsFDH 的催化活性随着温度的上升而上升。经过考察，发现各模块酶的反应条件可以兼容。

（2）通过分子改造提高了 StDAPDH/H227V 对中间体羟基丙酮酸的催化活性，从而提升了整个多酶级联路线的催化效率。利用分子对接预测了口袋中与底物结合的四个关键残基 92D、122D、152M 和 253N，通过单点饱和突变获得 4 株活性明显提高的突变体 D92E、D122W、M152S 和 N253Y，再进行迭代突变，最终获得一株 D92E/D122W/M152S 突变株，比活提高了 8.11 倍。利用分子动力学推测酶活性提高的原因可能与活性口袋大小的变化以及底物与关键残基之间分子相互作用的增强有关。

（3）将氧化脱氨模块（PmirLAAD）、还原胺化模块（StDAPDH/H227V/D92E/D122W/M152S）和辅酶循环模块（BsFDH）进行组装，构建成多酶级联体系，考察其催化性能，以及对其他氨基酸的催化效率。为了能使该多酶级联路线生成 D-Ser 的产率达到最大，本研究从 pH、温度、酶添加比例等方面进行了调节优化，发现该路线在 50 mM Tris-HCl 缓冲液（pH 9.5）、甲酸钠浓度为 100 mM、$NADP^+$浓度为 2.5 mM、$NH_4Cl$ 浓度为 100 mM、PmirLAAD 全细胞 50 $mg \cdot mL^{-1}$、StDAPDH/H227V/D92E/D122W/M152S 纯酶 4 $mg \cdot mL^{-1}$ 和 BsFDH 纯酶 0.7 $mg \cdot mL^{-1}$，反应温度为 32°C 时达到最大催化效率，以 50 mM L-Ser 为底物时，产率可以达到 96.5%，*ee* 值>99%。通过考察，发现该多酶级联路线还可以催化多种小分子 D-氨基酸的合成，在工业上具有较大潜力。

**关键词：**D-丝氨酸；多酶级联；分子改造；L-氨基酸脱氨酶；D-氨基酸脱氢酶

# Abstract

D-Serine (D-Ser) plays the role in regulating the function of the human nervous system. In the field of medicine, it can be used as a drug intermediate for the treatment of pulmonary tuberculosis caused by infection to synthesize D-cycloserine. It can also be used as a drug for the treatment of human cocaine dependence, schizophrenia, cerebellar work disorders. In the field of cosmetics, D-Ser and its derivatives can also be used as active substances. At present, the methods of synthesizing D-Ser in industry are mainly divided into chemical method and biological method, which generally have the disadvantages of environmental protection, low yield and low optical purity. Previously, our laboratory has constructed a multi-enzyme cascade route for the synthesis of D-amino acids containing an oxidative deamination module, a reductive amination module and a coenzyme circulation system. The route is coupled with L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*, D-amino acid dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*, and BsFDH from *Burkholderia stabilis*, which can finally synthesize D-amino acids from cheap and easily available L-amino acids. The product has high optical purity, simple steps and low cost. At present, the laboratory has successfully used this route to synthesize phenylalanine, and the substrate conversion rate and optical purity of 80 mM can reach 100 %. After investigation, it was found that the yield and optical purity of D-Ser synthesized by this route were very low. In order to construct a multi-enzyme cascade system that can efficiently synthesize D-Ser, this study intends to improve the reaction route. The specific results are as follows:

（1）Through catalytic activity detection, the tool enzymes required for each module of the multi-enzyme cascade route were determined, and the catalytic properties of each module were investigated. The optimum temperature of PmirLAAD was 42°C. Therefore, PmirLAAD was suitable for catalysis under alkaline conditions and was less affected by pH. The optimum pH of StDAPDH/H227V was pH 9.5, and the catalytic activity was less affected by temperature between 35°C and 50°C. There was no reverse reaction catalyzed by PmirLAAD and StDAPDH/H227V. The catalytic activity of BsFDH decreased slightly with the increase of pH in the alkaline environment of pH 7.0-10.5, but the change was not obvious. At 25-50°C, the catalytic activity of BsFDH increased with the increase of temperature, so its

reaction conditions can be compatible with other module tool enzymes.

（2）The catalytic activity of StDAPDH/H227V for the intermediate hydroxypyruvate was improved by molecular modification, thereby improving the catalytic efficiency of the entire multi-enzyme cascade route. Four key residues 92D, 122D, 152M and 253N in the pocket were predicted by molecular docking. Four mutants D92E, D122W, M152S and N253Y with significantly improved activity were obtained by single point saturation mutation, and then iterative mutation was carried out. Finally, a D92E/D122W/M152S mutant was obtained, and the specific activity was increased by 8.11 times. The reason for the increase of enzyme activity may be related to the change of active pocket size and the enhancement of molecular interaction between substrate and key residues.

（3）The oxidative deamination module (PmirLAAD), the reductive amination module (StDAPDH/H227V/D92E/D122W/M152S), and the coenzyme cycle module (BsFDH) were assembled to construct a multi-enzyme cascade system, and its catalytic performance and catalytic efficiency for other amino acids were investigated. In order to maximize the yield of D-Ser produced by the multi-enzyme cascade route, the pH, temperature, and enzyme addition ratio were adjusted and optimized. It was found that the route was 50 mM Tris-HCl buffer, temperature 32°C, sodium formate concentration 100 mM, $NADP^+$ concentration 2.5 mM, $NH_4Cl$ concentration 100 mM, PmirLAAD whole cells, StDAPDH/H227V mutant pure enzyme and BsFDH pure enzyme were added at 50 $mg \cdot mL^{-1}$, respectively. The maximum catalytic efficiency was achieved at 4 $mg \cdot mL^{-1}$ and 0.7 $mg \cdot mL^{-1}$, which could catalyze the complete conversion of 50 mM L-Ser to D-Ser. Through investigation, it was found that the multi-enzyme cascade route can also catalyze the synthesis of a variety of small molecule D-amino acids, which has great potential in industry.

**Keywords:** D-Serine; Multienzyme cascade; Molecular modification; L-amino acid deaminase; D-amino acid dehydrogenase

# 目　录

第一章 绪论.....1
1.1 D-氨基酸简介.....1
1.1.1 D-氨基酸的功能和分布.....1
1.1.2 D-丝氨酸的应用.....1
1.1.3 D-丝氨酸的合成方法.....1
1.2 多酶级联体系.....4
1.2.1 多酶级联体系的设计.....4
1.2.2 体内多酶级联体系.....6
1.2.3 体外多酶级联体系.....6
1.2.4 多酶级联体系合成 D-氨基酸.....10
1.3 L-氨基酸脱氨酶.....13
1.4 D-氨基酸脱氢酶.....14
1.4.1 D-氨基酸脱氢酶简介.....14
1.4.2 D-氨基酸脱氢酶的分子改造.....15
1.5 立题依据与研究意义.....16
1.6 本研究的主要研究内容.....16
第二章 材料与方法.....18
2.1 菌株与质粒.....18
2.2 试剂与仪器.....18
2.3 培养基与溶液.....20
2.4 L-氨基酸脱氨酶和 D-氨基酸脱氢酶的检测.....20
2.4.1 重组菌株的蛋白表达.....20
2.4.2 细胞破碎.....20
2.4.3 蛋白纯化.....21
2.4.4 模块催化反应.....21
2.4.5 D-丝氨酸和 L-丝氨酸的检测.....22
2.4.6 羟基丙酮酸的检测方法.....22
2.5 StDAPDH/H227V 的分子改造.....22
2.5.1 StDAPDH/H227V 的分子建模和对接.....22
2.5.2 StDAPDH/H227V 的饱和突变.....23
2.5.3 筛选突变体的高通量方法.....27
2.5.4 筛选动力学参数的测定.....28
2.6 多酶级联体系的组装.....28
2.6.1 级联催化反应中各催化剂的组合.....28

2.6.2 级联催化体系催化多种 L-氨基酸不对称合成 D-氨基酸 ....29
第三章 结果与讨论 .....30
3.1 氧化脱氨模块的构建.....30
3.1.1 L-氨基酸脱氨酶的表达.....30
3.1.2 L-氨基酸脱氨酶催化特性的考察.....30
3.1.3 L-氨基酸脱氨酶的酶活测定.....31
3.2 还原胺化模块的构建.....33
3.2.1 D-氨基酸脱氢酶的表达和筛选 .....33
3.2.2 StDAPDH/H227V 催化特性的研究.....34
3.3 StDAPDH/H227V 的分子改造.....36
3.3.1 StDAPDH/H227V 的同源建模和关键位点预测 .....36
3.3.2 高通量筛选方法的构建.....36
3.3.3 突变体的催化活性和结构分析.....38
3.4 多酶级联体系的组装.....41
3.4.1 辅酶循环系统.....41
3.4.2 多酶级联体系的组装.....44
主要结论与展望 .....51
主要结论.....51
展望.....52
参考文献.....53

# 第一章 绪论

## 1.1 D−氨基酸简介

### 1.1.1 D-氨基酸的功能和分布

D-丝氨酸（D-Ser）是一种手性的非天然氨基酸，不能被用于蛋白质的合成。近年来，人们发现它在哺乳动物的海马体、前脑、纹状体等部位具有较高的浓度。在哺乳动物的大脑中，D-Ser 作为 N-甲基天冬氨酸（NMDA）谷氨酸受体的共激动剂，负责行为、学习和记忆。D-Ser 的代谢与 NMDA 受体功能改变相关的疾病有关，比如癫痫、精神分裂症、缺血和神经退行性疾病[1, 2, 3]。D-Ser 的代谢障碍可能会导致神经系统发育缺陷，诱发抑郁症等多种精神疾病，对人体具有重要功能[2]。

### 1.1.2 D-丝氨酸的应用

D-Ser 起到调节人类神经系统的功能，在医药领域，可以作为治疗由感染引起的肺结核病的药物中间体合成 D-环丝氨酸，也可以用作治疗人类可卡因依赖症、精神分裂症、小脑共济失调等的药物。在化妆品领域，D-Ser 及其衍生物还可以作为活性物质[4]。

### 1.1.3 D-丝氨酸的合成方法

D-Ser 在医药，化妆品领域具有重要作用。近几十年来，国内外市场对 D-Ser 及其衍生物的需求越来越大。但 D-Ser 从自然界中很难获得，开发新的 D-氨基酸合成方法成为了研究热点。目前，已知的合成 D-Ser 的方法有化学合成法，其中主要包括不对称合成和化学拆分法。随着生物技术的发展，生物合成法也越来越受到关注，目前主要包括酶催化法和酶拆分法。

化学法合成D-Ser主要是通过从潜手性底物出发不对称直接合成和拆分D,L-氨基酸的外消旋体。不对称合成法以羟基丙酮酸（HPPA）等非手性化合物作为出发原料，在手性催化剂等条件下将HPPA催化成对应的D-Ser，使其优先选择产生特定立体异构体的反应。化学拆分法通过往外消旋丝氨酸中加入乙酸酐，两者进行酰基反应，致使外消旋体的理化性质发生了变化，加入酰化酶，经过结晶，过滤等步骤仅使L-丝氨酸（L-Ser）析出，获得D-Ser[5]。Schollkopf等人将L-Ser和Gly缩合制得环二肽，再与

Meerwein盐作用得甲基醚，经丁基锂脱质子得甘氨酸负离子，然后再经过烷基化和酸水解，最终获得D-Ser[6]。此法所得氨基酸的*ee*值可达95%以上。化学法虽然可以合成D-Ser，但是往往操作繁琐，会产生大量废弃物、不环保、污染环境，并且有些反应需要有重金属离子的参与，价格昂贵，分离困难，产物的光学纯度低。

生物合成法与化学合成法相比，具有节能环保、操作简便、催化反应立体选择性高、
反应条件较温和等优点，是最具潜力和开发价值的方法。目前已知的能够合成D-Ser的酶有很多，比如N-酰基-D-氨基酸酰胺水解酶、D-海因酶、N-氨甲酰基-D-氨基酸酰胺水解酶（D-N-氨甲酰水解酶)、D-氨基酸酰胺酶、蛋白酶、氨基酸氧化酶和D-氨基酸转氨酶[7]。近几年随着生物技术的发展，许多酶催化路线被开发出来用于合成D-Ser，比如脂肪酶、蛋白酶、氨基酰化酶、酰胺酶、海因酶的酶促手性拆分，α,β-不饱和酸的对映选择性加成，羟基丙酮酸的不对称还原胺化，氨基向酮酸的不对称转移，以及醛醇缩合等[8]。但是，由于大部分产生或降解氨基酸的酶只对L-对映异构体具有立体特异性，这些方法具有一定的限制。目前应用最广泛的方法是酶拆分法，Sumida等人发现了一种来源于贪铜杆菌（*Cupriavidus* sp.）的D-琥珀酰胺酶，以100 mM的N-琥珀酰-D,L-丝氨酸为底物，催化24 h后最终获得D-Ser[9]。该方法虽然可以生成D-Ser，但是产物的光学纯度不高、产率低，无法满足市场的需求。除此之外，酶拆分法还可以D,L-丝氨酸外消旋体为底物，利用L-氨基酸氧化酶的立体异构选择性达到分离D-Ser的目的[10]。L-氨基酸氧化酶是一种黄素氧化酶，以FAD为辅酶，具有严格立体异构专一性，来源于红球菌（*Rhodococcus* sp.）的L-氨基酸氧化酶能够催化L-Ser氧化脱氨生成HPPA[11]，还原的FAD被氧化成$H_2O_2$，最终分离出D-Ser，但理论产率只有50%，无法达到工业的需求[12, 13]。

碱性D-肽酶是一种具有立体异构专一性的内肽酶。D-氨基酸肽酶（EC 3.4.11.19）能够催化水解含有D-Ser的肽的N端[14, 15]，D-丙氨酸（D-Ala）是最常用的催化底物。Asano等人从*Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38中分离并鉴定出了一种D-氨基酸肽酶[16]，其可催化含丝氨酸的肽和D-丝氨酸酰胺，最终得到D-Ser。肽类底物比氨基酸酰胺的应用更广泛，通过与α-氨基酰胺消旋酶耦联，反应能以100%的产率和>99%的*ee*值合成一系列D-氨基酸[17, 18]。除此之外，来源于*Bacillus cereus*的D-肽酶也可以合成D-Ser[19, 20]。

以D-氨基酸酰胺为原料，利用D-氨基酸酰胺酶催化定向立体异构水解生成D-氨基

酸也是一种合成D-Ser的方法。D-氨基酸酰胺酶（EC 3.5.1.x）能够催化D-丝氨酸酰胺立体专一性水解成D-Ser和氨，目前已经有多种D-氨基酸酰胺酶被成功分离和表征出来。严格来说，来自*O. anthropi* SV3的D-氨基酸酰胺酶是该家族第一个D-立体异构专一性氨基酸酶，于1989年被发现，Komeda等人将其克隆于大肠杆菌中并进行表达和纯化，发现其对D-Ser酰胺、含有芳香或疏水侧链的D-氨基酸酰胺，如D-苯丙氨酰胺、D-酪氨酰胺等有活性[21, 22, 23]，通过易错PCR对该酶进行分子改造[24]，提高其热稳定性和催化活性，并对其进行了晶化，得到了一株优良突变体，提高了其对D-氨基酸酰胺，如D-甲硫氨酸酰胺、D-谷氨酰胺、D-赖氨酰胺的活性。

N-酰基-D-氨基酸酰胺水解酶能够催化N-酰基-D-丝氨酸水解为D-Ser和脂肪酸，因此也可以用于D-Ser的合成[25, 26, 27]。目前，N-酰基-D-氨基酸酰胺水解酶已从产碱杆菌、贪噬菌中发现并报道[28, 29]。来源于*Achromobacter xylosoxydans* A-6的N-酰基-D-氨基酸酰胺水解酶已被Amano Enzyme公司生产并作为商业酶出售[30]。

D-琥珀酰酶和N-琥珀酰氨基酸消旋酶可将N-琥珀酰-D-氨基酸对映选择性水解为相应的D-氨基酸。Sachio等人利用来源于*Cupriavidus* sp.P4-10-C的D-琥珀酰酶和来源于*Geobacillus stearothermophilus* NCA1503的N-琥珀酰氨基酸消旋酶对N-琥珀酰氨基酸进行动态动力学拆分，改进了一锅酶法生产D-氨基酸的方法[31]。在该研究中，D-琥珀酰酶对N-琥珀酰-D-丝氨酸的活性和N-琥珀酰氨基酸消旋酶对N-琥珀酰-L-丝氨酸的活性都是在检测的所有氨基酸中活性最低的，因此以N-琥珀酰-D,L-丝氨酸作为起始原料，证明该方法的可行性。结果表明，以100 mM N-琥珀酰-D,L-丝氨酸为底物时最终转化率可以达到81.8%，*ee*值94.7%。除此之外，研究学者还开发出了一条基于相应的α-酮酸还原胺化合成D-氨基酸的实用有效的生物催化路径[32, 33]。通过重组整体获得由工程脱氢酶组成的细胞系统和辅因子回收装置，反应表现出色的对映选择性（98%）[34, 35]，并且在制备规模上具有良好的产量，适用于各种基材[36, 37, 38, 39]。此外，还改造了变异酶的结构以允许反应速率在能够检测的范围内，工程全细胞催化剂也用于介导D-Ser及其衍生物的生产。这种方法的缺点是需要特定的底物，且产率较低，无法满足市场上越来越大的需求量，不适用于工业生产。

D-Ser还可以通过海因酶来合成。海因酶是一种酰胺水解酶，可以催化D-海因开环，生成D-N-氨甲酰氨基酸，然后通过D-氨甲酰酶的催化转化为对应D型氨基酸[40, 41, 42]。该种方法可以用于合成多种D-氨基酸，每年生产的非天然氨基酸可达数千吨[43, 44, 45]。海因酶以D,L-5-海因为起始原料，被D-海因酶水解为氨甲酰衍生物，然后通过N-氨

甲酰基-D-氨基酸酰氨水解酶的脱羧反应生成D-Ser[46, 47, 48]。D-海因酶和N-氨甲酰基-D-氨基酸酰氨水解酶在微生物中分布广泛，在一些微生物中，两种酶的编码基因成簇存在，这使得分离过程比较简单。该方法生产的最多的非天然氨基酸是D-苯甘氨酸和D-对羟基苯甘氨酸，也可以用于D-Ser的合成。虽然在工业上该方法已成功应用于D-氨基酸的生产，但主要存在以下三点不足。其一，该合成方法能制备的D-氨基酸种类有限；其二，天然D-海因酶的酶活往往较低；其三，D-海因酶的底物溶解性较低。为了克服这些缺点，人们优化了野生菌株的生长和酶促反应，Lee等人在建立反应时，通过考虑pH、诱导剂、铵盐、磷酸盐、重金属和其他离子的添加量，将D-海因酶活性提高了10倍[49]。除此之外，还在大肠杆菌中共表达了D-海因酶和D-氨甲酰水解酶，同时敲除了与D-氨基酸降解相关的酶，如D-氨基酸脱氢酶和D-氨基酸脱水酶。Turner等人通过DNA改组提高了D-海因酶的热稳定性，并提高了底物的可溶性[50]。

除了海因酶，还可以利用转氨酶催化潜手性底物发生不对称合成反应生成D-氨基酸。D-氨基酸转氨酶（D-AAT，EC2.6.1.21）能够催化氨基从D-丙氨酸转移到HPPA上生成D-Ser，其他多种D-氨基酸也可以由该方法合成[51]。转氨酶广泛存在于动植物之中，并且以吡哆醛-5'-磷酸酯作为辅因子。来源于唾液乳杆菌（*Lactobacillus salivarius*）的D-氨基酸转氨酶可以催化HPPA还原胺化生成D-Ser。除了HPPA，其还可以催化包括酮基丁酸、乙醛酸、吲哚-3-丙酮酸、α-酮戊酸、3-甲基-2-酮丁酸和4-羟基丙酮酸在内的酮酸还原胺化成对应的D-氨基酸。该反应能够实现高效转化，因为它在热力学上是有利的，但是由于所需要的底物α-酮酸获得渠道较少，并且成本比较昂贵，不易于投入大规模生产。

## 1.2 多酶级联体系

### 1.2.1 多酶级联体系的设计

目前，工业上合成 D-Ser 的生物法和化学法普遍还存在着产率低、光学纯度低、成本高等缺点，造成 D-Ser 价格昂贵。因此，开发新的能够高效合成 D-Ser 的方法越来越受到人们关注。随着生物技术的不断发展，研究学者挖掘酶的方法不断改进，酶工具箱不断扩大，科学家们开始设计出更多的催化反应路线。有一种完全从头构建酶的合成途径的方法，通常叫做多酶级联法，多酶级联法是指有两个或以上的酶催化反应步骤在一个容器种同时进行，并且反应的过程中不需要对中间产物进行分离，直接获得最后的目的产物[52, 53, 54]。“人工级联”是指通过人工设计一条生物级联催化反应

路线，该级联反应路线通常采用两种或两种以上的生物催化剂[55]，每种催化剂通常来源于不同的生物体，可以是纯酶，也可以是粗酶、固定化酶、全细胞[56, 57, 58]。相对于单步催化反应，多酶级联反应通常以廉价易得的底物出发，通过多步催化，最终获得昂贵的高附加值产物，避免了中间产物的分离，提高了生产效率，操作步骤简单，节约成本。

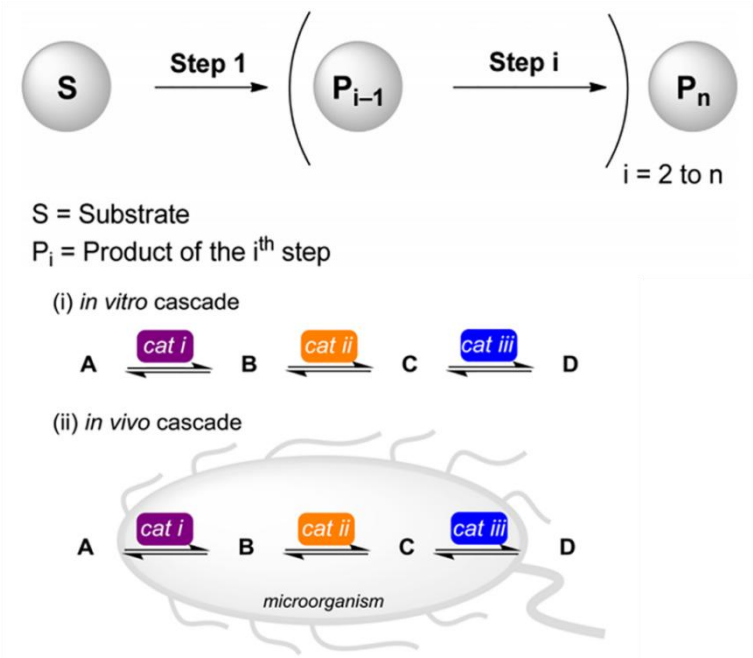


图1-1 多酶级联反应路线[56-58]

Fig. 1-1 Multienzyme cascade reaction route[56-58]

在设计多酶级联反应路线时，必须遵照以下原则：第一，每一步的酶催化反应必须具有高度立体异构选择性，以避免不同底物之间不必要的交叉反应，特别是最后一步，应该始终向着生成目标产物的方向进行；第二，确定设计的多酶级联催化体系中所涉及到的多种酶的反应条件，包括pH、温度等能否兼容，如果体系中有助溶剂参与，还要确定参与反应的酶对助溶剂是否具有耐受性；第三，整个反应动力学参数由酶活性控制，以确保反应的通量，且整个反应在动力学上是可行的[59, 60, 61]。

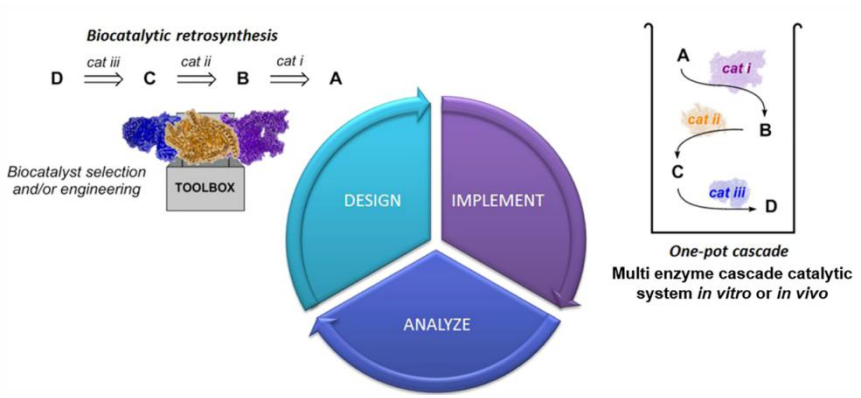

图1-2 多酶级联路线设计原则[59, 60, 61]

Fig. 1-2 Multi-enzyme cascade route design principles[59, 60, 61]

### 1.2.2 体内多酶级联体系

多酶级联法分为体内级联和体内级联，体内级联需要采用分子克隆等方法将级联反应路线中的所有酶在同一个宿主细胞中进行表达，利用全细胞催化反应进行[62, 63, 64]。体内多酶级联反应路线通常以代谢通路较简单的*Escherichia coli*作为宿主细胞，相比体外级联，将反应路线中的酶在同一宿主细胞内表达有很多优势，比如不需要添加辅助因子、在反应之前不需要进行细胞裂解及蛋白纯化等处理，操作更加简便，成本更低，更适合用于工业生产，并且因为路线中所有酶都在一个宿主细胞中表达，催化剂在空间上距离更近，缩短了底物的传输路径，催化效率较高。Xu等人已成功将来源于*Bacillus megaterium*的葡萄糖脱氢酶（BmGDH）和来源于*Exiguobacterium sibiricum*的亮氨酸脱氢酶（EsLeuDH）在大肠杆菌中共表达，该条路线的BmGDH能够以葡萄糖为辅底物催化三甲基丙酮酸还原胺化，最终生成L-叔亮氨酸[65]。

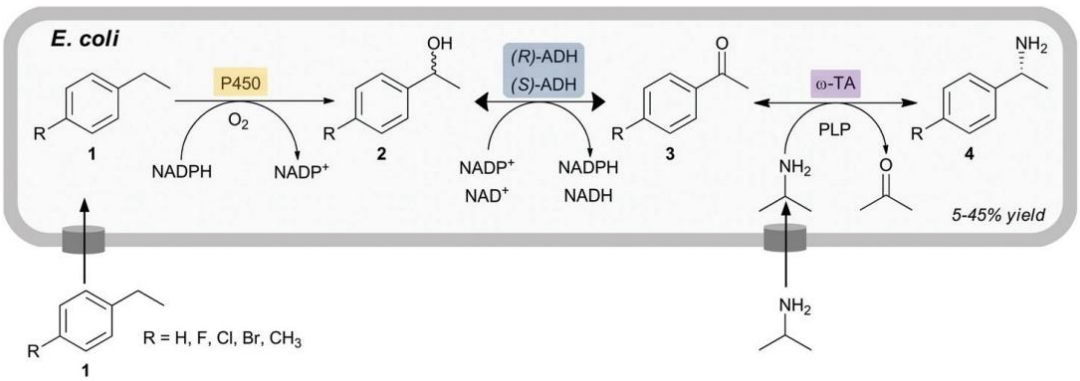


图1-3 多酶级联路线合成(*R*)-1-苯乙胺[66]

Fig. 1-3 Synthesis of (*R*)-1-phenylethylamine by multi-enzyme cascade route[66]

Busch 等人从头设计了一条合成(*R*)-1-苯乙胺的体内多酶级联催化路线，该路线利用 P450 单加氧酶催化 C-H 氧化成苯甲醇，苯甲醇被醇脱氢酶（ADH）氧化成酮，再通过转氨酶（ω-TA）的催化最终生成(*R*)-1-苯乙胺[66, 67]。该路线中四种酶均在同一个大肠杆菌中表达，反应中需要的辅因子也均由大肠杆菌提供。为了能使酶正常表达，该研究采取了双质粒共表达系统，最后成功合成了目的产物。

### 1.2.3 体外多酶级联体系

体外级联催化反应路线需要将酶从宿主细胞中分离出来，放到同一个反应容器中

反应。该方法在化学领域具有较长的发展历史。体外多酶级联体系基于天然或非天然代谢途径，通过在体外组装多个酶，实现目标产物的高效生产，是一种新的潜力巨大的化合物合成平台，具有反应速率快、选择性高、易于操作等优势，已被应用于基于二氧化碳生产淀粉等创新研究[68, 69, 70]。但体外多酶级联体系存在生物催化剂制备和添加外源辅因子成本高等问题。

Krouti等人设计了一条级联体外反应路线，第一步的酪氨酸酚裂解酶催化底物与丙酮酸盐进行反应，生成L-酪氨酸中间体，形成C-C键[71]。第二步L-酪氨酸中间体经过酪氨酸解氨酶的催化，脱氨形成香豆素酸衍生物，再经过阿魏酸脱羧酶催化脱羧，实现了酚类物质对位的乙烯基化，副产物易于分离，转化率高达99%。体外级联反应路线可以用冻干细胞、固定化细胞、纯酶、粗酶等多种形式的催化剂。相比于体内级联催化，在设计体外反应时使用纯酶可以免除细胞代谢网路中副产物的影响，也可以通过对每个模块酶的浓度进行适当调整，从而使整个路线的转化率达到最高，更加可控[72, 73]。但是，体外级联路线通过需要添加一些外源性因子来维持反应的进行，比如NADPH和FAD，这些外源因子价格普通高昂。针对这一问题，Turner等人利用脱氢酶（AmDH）和乙醇脱氢酶（ADH）实现了辅酶因子NADH的循环[74]。该路线中，$NADP^+$在第一步醇被氧化成酮的反应中还原成NADPH，随即又在第二步酮还原成手性胺的反应中氧化成$NAD^+$，实现了“借氢”的过程。

Rother 等人耦联了硫胺素二磷酸（ThDP）依赖型乙酰羟基酸合成酶 I（AHAS-I）和ω-转氨酶（*R*-TA 或 *S*-TA），以廉价的苯甲醛和丙酮酸为原料合成了(*1R,2S*)-去甲麻黄碱和(*1R,2R*)-去甲伪麻黄碱[75]。AHAS-I 可以催化丙酮酸脱羧和催化苯甲醛羰基化，最终得到 *ee* 值>99%的(*R*)-苯乙酰基甲醇。*R*-TA 或 *S*-TA 可以对其进行还原胺化，最终生成目的产物，该多酶路线降低了副产物生成量，节约了成本。

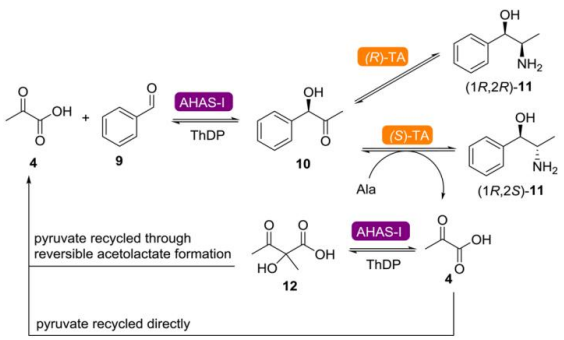


图1-4 多酶级联路线合成(1*R*, 2*S*)-去甲麻黄碱和(1*R*, 2*R*)-去伪甲麻黄碱[75]

Fig. 1-4 Synthesis of (1*R*, 2*S*)-norephedrine and (1*R*, 2*R*)-norpseudoephedrine by multi enzyme cascade catalysis[75]

松脂醇属于植物雌激素，是一种高价值化合物，对多种疾病具有治疗作用，因此引起了制药行业的兴趣。从植物中分离松脂醇产量较低，其化学合成涉及多个步骤。Rickelfs等人设计了一种新颖的两步一锅酶级联法，结合香草醇氧化酶（VAO）和细菌漆酶（EA），以丁香酚为底物，经由中间体松柏醇生产松脂醇[76]。在该多酶路线中，选择来源于*Penicillium simplicissimum*的VAO用于催化丁香酚的氧化，接着通过酶筛选发现了三种合适的细菌漆酶，它们都能催化松柏醇合成松脂醇。最后，研究从酶比例、pH值和有机溶剂的存在等方面对级联反应进行优化。在优化条件下，松脂醇浓度达到了4.4 mM。

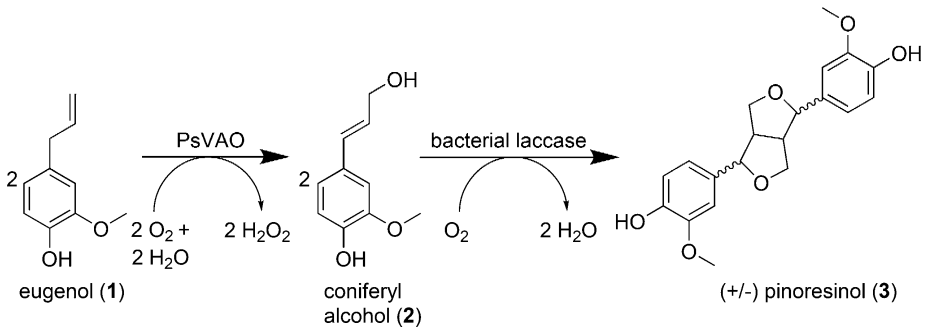


图1-5 多酶级联路线合成松脂醇[76]

Fig. 1-5 Synthesis of pinoresinol by multi-enzyme cascade route[76]

对映体纯的氨基酸衍生物可以作为多肽类药物的基础化合物。目前从外消旋体到D-氨基酸衍生物的去消旋化可以通过L-氨基酸氧化酶和化学还原剂的反应来实现[77]。但是由于L-氨基酸氧化酶（LAAO）异源表达的困难，D-氨基酸衍生物的去消旋化发展较为缓慢。Nakano等人通过大肠杆菌表达系统（≤50.7 mg·L$^{-1}$）成功开发了具有广泛底物选择性（13种L-氨基酸）和高产率的祖先LAAO，并将其与$NH_3BH_3$偶联，通过去消旋合成了一系列D-氨基酸衍生物[78]。Ahmed等人开发并优化了一种多酶级联路线合成了一系列非天然的D-二芳基丙氨酸衍生物[79]，该路线以4-溴代肉桂酸和4 -溴苯基丙酮酸为起始原料，耦联了苯丙氨酸解氨酶（PAL）和D-氨基酸脱氢酶（DAADH），得到4-溴代苯丙氨酸的两个对映异构体，再与一系列芳基硼酸偶联，在温和的水相条件下以较高的产率和光学纯度得到目标化合物。

D-3,4-二羟基丁酸（3,4-DHBA）是一种重要的化学品，在化学和制药工业中有着广泛的应用。目前化学法生产3,4-DHBA需高浓度的NaOH提供强碱环境，选用剧毒的氰化物作为催化剂，对环境不友好[80]。通过传统代谢工程手段生物法合成3,4-DHBA存在合成线路涉及步骤多、生产效率和产量低等问题。Ma等人前期构建了以木糖为底

物，基于*Gluconobacter oxydans*和重组*Escherichia coli*共培养生产3,4-DHBA的技术体系，最优条件下3,4-DHBA产量达到3.26 $g\cdot L^{-1}$，产率达到87%[81]。之后又发现来源于*Streptomyces coelicolor* A3中的醇醛氧化酶可同时催化木糖和3,4-二羟基丁醛的氧化，在此基础上构建了一个由醇醛氧化酶、二羟基羧酸脱水酶、α-酮酸脱羧酶和过氧化氢酶组成的多酶偶联体系[82]，在最适条件下，以木糖为底物，D-3,4-DHBA的产量为4.55 $g\cdot L^{-1}$，达到理论产率的83%。该研究应用醇醛氧化酶替代两种NAD依赖型脱氢酶实现木糖和3,4-二羟基丁醛的氧化，可减少体外多酶级联体系所需酶的数量，且反应体系中无需昂贵辅因子NAD和ATP的添加。该研究提出了D-3,4-DHBA生物法生产的可行路线，同时为来源于半纤维素的木糖资源化利用提供了新的选择。

限域微环境中的级联反应可以有效降低扩散势垒、提高中间体的局部浓度，具有高度的原子经济性。将酶在框架结构上进行整合，以模拟高效的生物级联系统，具有很大的应用前景和价值[83]。金属有机框架（MOFs）具有表面易功能化、组分多样、可调节孔径、比表面积高等诸多优点，是封装酶的理想框架材料之一。基于隔室化思想，研究学者通过精准调控中间体的扩散路径，构建了层次化支架，实现了多酶有序隔室化封装，有效提高了酶的稳定性和协同催化的能力[84]。相比传统的单腔室封装，这类多腔室封装酶级联反应效率提高了15.4倍，MOFs封装酶催化剂用量可降至 2 $\mu g\cdot mL^{-1}$；温和的反应条件适用于葡萄糖氧化酶、辣根过氧化物酶、蛋白酶、乙醇脱氢酶等多种级联系统的隔室化封装，有望进一步拓展酶级联在体外生物催化、化工制药、疾病诊疗等领域的应用。为实现多酶催化反应高效、有序进行，生物体发展出隔室化和底物通道两大策略，分别保证了多酶催化反应的稳定性和高效性。隔室化策略是指通过半透膜将多酶限制在膜内隔室中，保护酶分子不受外部因素攻击，提高酶分子稳定性的方法[85]。底物通道策略是指通过分子链或特定相互作用，形成分子或纳米级通道，促进中间产物在酶分子间的传递，获得多酶催化级联反应超高催化活性的方法。基于隔室化思想，研究学者先后实现了多酶随机分布隔室化和多酶有序分布隔室化，用于$CO_2$转化，尿酸检测，葡萄糖氧化等一系列催化反应。通过多酶有序分布隔室化，将甲酸脱氢酶（FDH）、甲醛脱氢酶（FaldDH）和醇脱氢酶（ADH）依次固定在囊腔内、囊壁内侧和囊壁外侧，实现了CO2由囊腔内至囊腔外依次转化为甲酸、甲醛和甲醇。甲醇产率达到游离多酶系统的2倍，储存和循环稳定性得到很大提升。基于底物通道思想，研究学者构建了邻近模型和化学摆臂底物通道等，用于木糖转化，甲醇氧化和葡萄糖氧化等，实现了酶促反应在体外的高效进行。将6-磷酸葡萄糖脱氢酶

（G6pDH）和苹果酸脱氢酶（MDH）固定化在DNA骨架上，利用化学摆臂接枝NADH促进氢负离子在酶分子间的传递，级联反应的催化活性相比于游离NADH提升了91倍。此外，研究者将隔室化与底物通道在体外结合，构建多酶催化系统，实现了稳定性和催化活性的协同提升。

酶催化纳米反应器在临床上取得了优异的治疗效果，但如何在肿瘤微环境中准确发挥酶活性，特异性杀伤肿瘤细胞，避免全身氧化损伤，是催化纳米医学不可避免的挑战。Liu等人制造了一种肿瘤多酶级联反应，该反应结合特异性杀死肿瘤细胞并保护细胞免受氧化应激，通过使用硼氢化钠还原反应合成了SOD（SOD-Fe-0），接下来，SOD-Fe-0和Lapa货物通过自组装封装在ZIF-8中，为了保护货物酶不被蛋白酶消化，延长血液循环时间，将SOD-Fe-0@Lapa-Z进一步包裹红细胞膜，并用叶酸靶向功能化，最终得到了先进的仿生纳米反应器SOD-Fe-0@Lapa-ZRF[86]。Wu等人设计了一个人工的三酶体系（组织蛋白酶B、氨肽酶A和二肽基肽酶IV），并利用一段DNA-多肽复合物为底物，来研究该体系中的级联反应过程[87]。该DNA-多肽复合物的肽段中含有以上三个酶的酶切位点，并且由于氨肽酶A和二肽基肽酶IV只在多肽氨基端暴露时才能发挥作用，因此这三个酶只能依次酶解底物。而DNA-多肽复合物及其酶解产物与葫芦脲结合后穿过α-溶血素纳米孔时均能产生不同的特征电流信号，有望被用来设计和评价不同的多酶体系中的底物通道效应。

### 1.2.4 多酶级联体系合成D-氨基酸

D-氨基酸广泛应用于制药、农业、食品和化妆品行业，且多种D-氨基酸已用于生产氨苄西林和阿莫西林、那格列奈、他达拉非、氟戊酸盐等药品[88, 89, 90]，例如，(*R*)-2-氨基-3-溴苯基丙酸是合成多巴胺D1受体（human dopamine D1 receptor）正向变构调节剂（D1 PAM）的重要原料[91]。D-氨基酸合成方法通常采用化学法，但化学合成存在路线步骤多、收率低、合成速度慢，产物分离困难等缺点。基于酶级联法的优点，人们开始尝试从头构建一条合成D-氨基酸的级联催化路线。

Tang等人开发了一种通过D-氨基酸氨基转移酶（DAAT）催化合成一系列D-氨基酸的合成工艺，但单独使用DAAT催化合成D-氨基酸转化率只有60%左右[92]，研究人员优化工艺，通过DAAT与乳酸脱氢酶（LDH）和甲酸脱氢酶（FDH）耦联技术，形成去除产物抑制的辅酶循环系统，使得转化率提高至99%以上。该三酶联用催化工艺可实现一锅法一步完成D-氨基酸的合成，相比化学法合成工艺，具有合成步骤少、反应条

件温和、收率高、绿色环保等优势。尽管酶催化有诸多独特优势，但游离酶作为催化剂使用的时候仍存在一些局限性，比如，游离酶稳定性低、与产物的分离过程繁琐、再利用困难，且存在蛋白质浸出到最终产品的风险。酶固定化通常有助于解决这些问题，通过酶的固定化可提高效率，降低生产成本，提高恶劣条件下酶的稳定性，允许重复使用，并使产物更容易从反应混合物中分离。

Mattos等人构建了一种双酶级联法路线不对称合成高丙氨酸[93]，第一步反应利用的来源于*Fusobacterium nucleatum*的蛋氨酸裂解酶（METase，EC 4.4.1.11）为吡哆醛-5-磷酸（PLP）依赖性酶，METase催化L-甲硫氨酸生成2 -氧代丁酸、铵和甲硫醇。第二个反应涉及来源于*Escherichia coli*（EC 2.6.1.42）的支链氨基酸氨基转移酶或者来源于*Bacillus* sp.的D-氨基酸氨基转移酶（EC 2.6.1.21），两者都能催化L -谷氨酸和2--氧代丁酸发生转氨基反应生成L -高丙氨酸，这两种转氨酶均为折叠IV型PLP依赖酶。甲硫氨酸是一种低成本、能够大量生产的天然氨基酸，能够在甲硫氨酸甲基转移酶的作用下原位转化。这种方法克服了使用昂贵的α-酮酸作为起始原料的缺点，成功合成了D-高丙氨酸，转化率32.5%，*ee*值大于99%。该种方法将METase与氨基酸转氨酶耦联，是一种用于生产非天然手性氨基酸的方法，但是关于转氨酶的平衡限制还需要在未来的工作中进一步改进解决[94]，以提高反应的整体产率。目前该种方法能够合成的D-氨基酸种类较少，且产率较低。

Nakajima等人通过耦联甲酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、谷氨酸消旋酶、D-氨基酸氨基转移酶构建出一条四酶级联反应路线，成功合成了多种D-氨基酸，产率均大于75%[95]。该路线以α-酮戊二酸和氨为底物，利用谷氨酸消旋酶和谷氨酸脱氢酶再生成D-谷氨酸，期间NADH也参与反应。随后，D-氨基酸氨基转移酶以D-谷氨酸和α-酮戊二酸为氨基供体合成相应的D-氨基酸。D-谷氨酸可以通过α-酮戊二酸、NADH、甲酸脱氢酶的偶联反应不断再生，NADH也可以通过BsFDH反应再生。因此，生产D-氨基酸只需要少量的L -谷氨酸和NADH。该路线可以成功合成D-丙氨酸，D-天冬氨酸，D-缬氨酸等多种氨基酸。随后又对该反应路线进行了优化[96]，在底物0.25-1.0 mM的范围内找到了生产D-氨基酸的最佳甲酸铵浓度，确定了α-酮酸的最佳浓度为50 mM，高于此浓度时，产率大大降低。为了使α-酮酸的浓度保持在这个浓度，在生产期间以分批的方式将α-酮酸投入到多酶体系中，反应35 h后，得到48 $g\cdot L^{-1}$的D-苯丙氨酸和60 $g\cdot L^{-1}$的D-酪氨酸，光学纯度均为100 %。

邻位氨基酸是合成抗生素和生物活性肽的重要原料，在大鼠脑、人额叶皮质等哺

乳动物组织中发现了大量的D-Ser、D-天冬氨酸等邻位D-氨基酸[97, 98]。然而，目前还没有简单快捷的制备邻位氨基酸的方法。多酶反应体系作为立体专一性生产的手段，越来越受到广泛的关注。谷氨酸消旋酶、谷氨酸脱氢酶等催化剂都可以从相应的α-酮酸合成除D-谷氨酸外的各种邻位氨基酸。Galki等人对Nakajima等人构建的四酶级联体系进行了改进，选择了耐热甲酸脱氢酶（FDH , EC 1.2.1.2）、丙氨酸消旋酶（Ala R , EC 5.1.1.1）和L-丙氨酸脱氢酶（L-AlaDH , EC 1.4.1)，通过热稳定的邻氨基酸氨基转移酶（DAAT , EC 2.6.1.21） 和上述三种热稳定酶催化的反应耦联，实现了辅酶循环，可以将多种α-酮酸转化为相应的D-氨基酸[99]。

支链氨基酸（D-BCAAs）包括D-亮氨酸、D-异亮氨酸和D-缬氨酸，是已知的肽类抗生素中间体，具有多种生物活性。Suzuki等人研究了一种能够高效不对称合成D-BCAAs的多酶级联反应路线[100, 101]。该路线耦联了两种热稳定性酶，分别是来源于*Ureibacillus thermophaericus*的热稳定$NADP^+$依赖型内消旋-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶（UtDAPDH）和葡萄糖脱氢酶。在$NADP^+$存在下，UtDAPDH可以催化D-氨基酸的可逆氧化脱氨反应，包括将D- BCAAs转化为相应的2-氧代酸、NADPH和氨。该路线利用UtDAPDH催化2-氧代酸进行还原胺化反应，葡萄糖脱氢酶对NADPH进行再生，形成了一条高效合成D-BCAAs的路线。

Hee-Sung Bea等人将谷氨酸消旋酶、谷氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶偶联起来构建出多酶级联体系，成功催化苯丙酮酸和羟基苯丙酮酸还原胺化，合成了D-苯丙氨酸（D-Phe）和D-酪氨酸[102]。

Shin等人利用来源于*Bacillus subtilis*的丙氨酸脱氢酶以及ω-转氨酶来进行D-氨基酸的合成[103]。在该路线中，丙氨酸脱氢酶将L-丙氨酸衍生物氧化成对应的α-酮酸，α-酮酸化合物被ω-转氨酶氨化成对应的D-氨基酸。该级联过程可以用于合成D-亮氨酸、D-丝氨酸等。

Chen等人通过耦联L-苏氨酸裂解酶、D-氨基酸脱氢酶以及甲酸脱氢酶，以L-苏氨酸为底物，最终成功合成了D-2-氨基丁酸[104]。D-2-氨基丁酸是氨基酸类衍生物，可用做生化试剂，手性药物、手性农药、手性食品添加剂的关键中间体，在医药、农药和食品领域有广泛应用。该多酶级联路线利用L-苏氨酸裂解酶裂解L-苏氨酸，生成2-氧代丁酸，2-氧代丁酸被D-氨基酸脱氢酶还原胺化，最终生成D-2-氨基丁酸，150 mM的底物转化率可以达到89%，*ee*值>99%。

转氨酶催化的转氨基反应和氨基酸脱氢酶催化的还原胺化反应两种生物催化反应

可用于光学纯非天然氨基酸的不对称合成。然而，尽管转氨酶表现出极大的多样性和广泛的底物谱，并且具有优异的对映选择性，但大多数转氨酶反应是可逆的，且需要氨基酸或胺作为共底物。而氨基酸脱氢酶催化的还原胺化反应虽然不可逆，且可以以氨作为氨基供体，但其具有严格的底物特异性，虽然催化反应的热力学常数很高，但其产物范围仅限于天然（蛋白源）氨基酸。为独立改进这两个过程，人们做了许多尝试。为了改变转氨基反应的平衡，进行了包括原位产物/副产物去除副产物降解，通过另一个转氨基回收氨基供体等方法。这些策略在一定程度上有效地改变了平衡，但仍然需要超过化学计量的氨基供体，同时不可避免的带来二次副产物，破坏了加工的简便性和原子经济性。据此，Zhou等人开发了一种三酶级联一锅法反应体系[105]，利用了转氨酶和氨基酸脱氢酶各自的优点。在这项工作中，转氨酶将氨基从天然氨基供体转移到底物上，生成所需的手性非天然产物，D-氨基酸脱氢酶从相应的酮酸中回收氨基供体，最后利用廉价的还原剂2-丙醇通过乙醇脱氢酶催化回收辅因子。与以前报道的使用大量氨基供体的方法不同，该三酶一锅催化体系可以发挥转氨酶和氨基酸脱氢酶各自的优势，4个亚组转氨酶与不同的氨基酸脱氢酶偶联，利用氨和辅酶NADPH合成了4种D-氨基酸，反应中加入的氨基供体几乎完全转化，最终合成的氨基酸具有高对映体纯度，*ee*值大于99 %。该路线虽然可以成功合成高光学纯度的D-氨基酸，但由于酶底物谱的限制，能合成的D-氨基酸种类有限，且辅酶价格昂贵，成本过高。

以上方法虽然都可以成功生成D-氨基酸，但也都存着很多问题，比如酶的限制条件比较苛刻，造成可以合成的D-氨基酸种类较少，一些酶需要引入氨基供体，虽然可以通过耦联其他酶消耗掉，但这大大提高了操作难度和成本。为了解决这些问题，Zhang等人设计了一条耦联L-氨基酸脱氨酶（LAAD）、D-氨基酸脱氢酶（DAPDH）和甲酸脱氢酶（FDH）三种酶的多酶级联反应路线[106]，该路线以廉价易得的L-氨基酸为底物，经过L-氨基酸脱氨酶催化氧化成对应酮酸，再通过D-氨基酸脱氢酶还原胺化成对应的D-氨基酸，完成了氨基酸的立体异构反转，并引入辅酶循环系统，实现了NADPH的循环使用。相比于之前的方法，该条路线需要的D-氨基酸脱氢酶在催化时不需要额外引入氨基供体，因此不会有副产物，易于分离，并且L-氨基酸脱氨酶在反应过程中不会有过氧化氢产生，不会积累有害物质。目前该方法已成功合成苯丙氨酸。

## 1.3 L-氨基酸脱氨酶

L-氨基酸脱氨酶（LAAD）是一种含有非共价结合FAD的膜蛋白，能够催化天然的

L-氨基酸立体异构氧化脱氨成对应的酮酸。和L-氨基酸氧化酶相比，L-氨基酸脱氨酶在催化使将电子转移到细胞色素中，不会积累有害物质，是较为理想的生成酮酸的催化剂。到目前为止，世界上只有四种L-氨基酸脱氨酶被发现并表征出来，分别是来源于*Proteus myxofaciens*的PmaLAAD、来源于*Proteus mirabilis*的PmirLAAD、Pm1LAAD和来源于*Proteus vulgaris*的PvLAAD[107]。目前，L-氨基酸脱氨酶主要应用于酮酸的合成。Wang等人成功以L-苯丙氨酸为底物，利用PmLAAD合成了苯乳酸，产率达到56.7%[108]。Chen等人以15 $g\cdot L^{-1}$的L-谷氨酸为底物，利用PmirLAAD催化最终生成4.65 $g\cdot L^{-1}$的2-酮戊二酸[109]，该物质是三羧酸循环中重要的中间产物之一，是氮的输送体和分子氧化中的共生物质，在微生物细胞的代谢中起着重要的作用，同样也是合成多种氨基酸和蛋白质的重要前体物质。Hasan等人利用PmirLAAD合成了苯丙酮酸[110]。苯丙酮酸是苯丙氨酸的脱氨基形式，可用于奶酪和葡萄酒香精的开发、苯丙酮尿症的诊断以及减少畜禽粪便中过量的氮积累。文献报道的苯丙酮酸发酵研究通常在摇瓶规模下进行,产量较低，之后研究学者开发了一种在台式生物反应器中利用L-氨基酸脱氨酶进行分批补料连续发酵生产苯丙酮酸的方法，苯丙酮酸浓度从1350 $mg\cdot L^{-1}$（分批发酵）提高到2958 $mg\cdot L^{-1}$。Zhu等人构建了一种用于合成D-芳基丙氨酸的多酶级联体系，该体系中的L-芳基丙氨酸被L-氨基酸脱氨酶氧化成对应的酮酸[111]。Wlton等人耦联了L-氨基酸脱氨酶和D-氨基酸氨基转移酶，合成了D-苯丙胺酸及其衍生物[112]。Hossian等人利用PvLAAD成功制备了61.5 $g\cdot L^{-1}$的α-酮-γ-甲基硫代丁酸[113]。除了合成酮酸，L-氨基酸脱氨酶也逐渐被用于生成D-氨基酸的多酶级联路线。Parmeggiani等人从肉桂酸出发，耦联苯丙氨酸裂解酶和L-氨基酸脱氨酶，最终获得目的产物L-苯丙氨酸[114]。

## 1.4 D-氨基酸脱氢酶

### 1.4.1 D-氨基酸脱氢酶简介

D-氨基酸脱氢酶是一种 NADPH 依赖型的氧化还原酶，可以催化α-酮酸还原胺化成对应的 D-氨基酸。与转氨酶相比，D-氨基酸脱酶在还原胺化时不需要引入氨基供体，可以利用氨离子催化α-酮酸合成对应 D-氨基酸。然而，D-氨基酸脱氢酶在生物界较为稀少，分布不如 L-氨基酸脱氢酶广泛，且几乎都以膜蛋白的形式存在，这很大程度上限制了人们对 D-氨基酸脱氢酶的研究和利用。目前人们对于 D-氨基酸脱氢酶的研究和应用主要集中在 meso-二氨基庚二酸脱氢酶（DAPDH，EC 1.4.1.16）上。DAPDH 主要分布在 *Brevibacterium* sp.、*Bacillus sphaericus* 等细菌中，可以识别天然

底物 *meso*-二氨基庚二酸（meso-DAP）D-手性碳上的氨基，催化其氧化脱氨。DAPDH 分为 I 型和 II 型，I 型对天然底物表现出高度的专一性，比如来源于 *U. thermosphaericus* 的 D-氨基酸脱氢酶（UtDAPDH）；II 型 DAPDH 则表现出了还原胺化的活性，能够催化α-酮酸还原成对应的 D-氨基酸，具有立体异构选择性，其中最具代表的是来源于 *Symbiobacterium thermophilum* 的 DAPDH（StDAPDH），该酶对 D-氨基酸底物没有活性，只对α-酮酸类底物有催化活性，是 DAPDH 家族第一个被发现可以天然催化α-酮酸还原胺化成 D-氨基酸的酶，具有重要的意义。经过研究发现，该酶对丙酮酸、苯丙酮酸等多种酮酸具有活性。

### 1.4.2 D-氨基酸脱氢酶的分子改造

DAPDH表现出了高度的D-立体选择性，在合成D-氨基酸方面具有巨大的潜力。StDAPDH被发现之前，Vedha-Peters等人对来源于*Corynebacterium glutamicum*的D-氨基酸脱氢酶（CgDAPDH）采取随机突变和定点突变，从大约100000株突变体中筛选住一株突变体BC621（Q150L/D155G/T170I/R196M/H244N），对环己基丙酮酸的活性提高了625倍[115]，在与其他酶耦联后，环己基丙酮酸的达到了95%，*ee*值>99%。Oshima等人对UtDAPDH进行分子突变，获得了底物谱较宽的突变体，并通过耦联葡萄糖脱氢酶，最终成功合成了D-亮氨酸。随后，Hason等人对来源于*B.sphaericus*的DAPDH（BsDAPDH）引入了CgDAPDH BC621相同的突变，成功合成出了(*R*)-5,5,5-三氟戊氨酸，产率可以达到85%[116]。

StDAPDH是meso-DAPDH家族中第一个被发现催化α-酮酸不对称还原胺化为D-氨基酸的成员，除天然底物外，还可以催化丙酮酸和4-甲基-2-氧代戊酸等酮酸还原胺化为D-丙氨酸和D-亮氨酸。Gao等人通过结构分析和位点突变探索了StDAPDH独特性质的分子机制，并在此基础上，对StDAPDH底物口袋中的氨基酸残基进行突变，获得了一株优良的突变体H227V[117]，其底物结合口袋扩大，对疏水性大位阻底物如苯丙酮酸和叔亮氨酸的酶活提高，为D-苯丙氨酸和D-叔亮氨酸的合成提供了基础。随后又对StDAPDH进行半理性设计和饱和突变，获得了对多种大位阻酸具有高活性的突变体W121L/H227I，成功合成了D-苯甘氨酸，D-色氨酸，D-叔亮氨酸，提高了对多种2-酮酸的比活力[118]。通过docking模拟，将StDAPDH野生型和突变体W121L/H227I分别和底物进行分子对接，结果发现突变体与野生型相比，底物结合口袋结构发生了改变，突变体可以容纳某些大位阻的底物，底物与辅酶的催化距离变近，使突变体获得了对某

些大位阻底物的催化活性。

通过一系列分子改造，DAPDH及其突变体成功以多种α-酮酸为底物合成出了对应的D-氨基酸，底物谱得到了拓宽。但是到目前为止，还未有关于DAPDH及其突变体对HPPA是否有活性的报道。若要利用DAPDH催化合成D-Ser，则还需要以HPPA为底物，挖掘寻找具有催化活性的DAPDH，必要时对其进行分子改造，以提高酶活。

## 1.5 立题依据与研究意义

D-Ser具有调节人类神经系统的功能，在医药、化妆品等领域具有重要作用。目前工业上合成D-Ser的方法主要分为化学法和生物法，但仍存在着不环保、产率低、光学纯度低等缺点。

先前研究已经构建出一条含有氧化脱氨模块，还原胺化模块和辅酶循环系统的合成D-氨基酸的多酶级联路线。该路线耦联了来源于*P. mirabilis*的L-氨基酸脱氨酶（PmirLAAD），来源于*S. thermophilum*的D-氨基酸脱氢酶突变体（StDAPDH/H227V）以及来源于*Burkholderia stabilis*的甲酸脱氢酶（BsFDH），以廉价易得的L-氨基酸为底物，经过PmirLAAD催化氧化成对应酮酸，再通过StDAPDH/H227V还原胺化成对应的D-氨基酸，完成了氨基酸的立体异构反转，并引入辅酶循环系统，实现了NADPH的循环。目前实验室已成功利用该路线合成苯丙氨酸，80 mM的底物转化率以及光学纯度均可达到100%。经过考察，发现该路线合成D-Ser的产率和光学纯度都很低，不适合用来合成D-Ser。为了构建一条能够高效合成D-Ser的多酶级联体系，本研究拟从两个方面对该反应路线进行改进：

（1）针对底物羟基丙酮酸，对限速步骤的酶StDAPDH/H227V进行分子改造，提高其对底物的催化活性，从而提高整个多酶级联反应路线的催化效率。

（2）优化该多酶级联反应路线的反应条件，包括温度、pH、各模块酶的添加比例，缓冲液种类等，使所有催化剂达到最佳合作，进一步提高该多酶级联路线催化L-Ser转化为D-Ser的效率，并且提高底物浓度，寻找多酶级联路线最佳的反应条件，使其能催化更高浓度的L-Ser。

## 1.6 本研究的主要研究内容

本论文的具体研究内容如下：

（1）以底物L-Ser和产物D-Ser为导向，挖掘寻找生物界存在的L-氨基酸脱氨酶，D-氨基酸脱氢酶和甲酸脱氢酶，通过测定动力学和酶活确定各模块所需的酶，并对多

酶级联路线各模块的催化性能进行研究，寻找催化剂的最适催化条件。

（2）为了提高多酶路线的催化效率，对还原胺化模块的酶StDAPDH/H227V进行分子改造。利用Autodock vina进行分子对接，确定用于饱和突变的关键残基，进行迭代突变，并构建合适的高通量筛选方法，筛选出优良的突变体，通过分子动力学模拟来解释酶活提高的机理。

（3）将多酶级联路线的氧化脱氨模块，还原加氨模块和辅酶循环系统进行体外组装，进行兼容测试。为了进一步提高催化效率，优化了级联路线的反应条件，包括温度、pH、酶浓度，对各个模块酶的添加比例进行了调节，构建出一条能够合成D-Ser的多酶级联路线，并考察了其催化性能和对其他酮酸底物的活性。

# 第二章 材料与方法

## 2.1 菌株与质粒

本研究所使用的菌株和质粒见表2-1。

表 2-1 菌株和质粒

Table 2-1 Strains and plasmids

| 菌株和质粒 | 用途 | 来源 |
|---|---|---|
| *Proteus mirabilis* | 目的基因来源 | 实验室保藏 |
| *Escherichia. coli* BL21(DE3) | 目的基因表达宿主 | 实验室保藏 |
| *Symbiobacterium thermophilum* | 目的基因来源 | 实验室保藏 |
| *Ureibacillus thermosphaericus* | 目的基因来源 | 实验室保藏 |
| *Lysinibacillus fusiformis* | 目的基因来源 | 实验室保藏 |
| *Corynebacterium glutamicum* | 目的基因来源 | 实验室保藏 |
| pET-28a | 表达载体 | 实验室保藏 |
| pET28a-PmirLAAD | *pmlaad* 基因插入载体 | 实验室保藏 |
| pET28a-UtDAPDH | *utdapdh* 基因插入载体 | 实验室保藏 |
| pET28a-LfDAPDH | *lfdapdh* 基因插入载体 | 实验室保藏 |
| pET28a-StDAPDH/H227V | *stdapdh* 基因插入载体 | 实验室保藏 |
| pET28a-BsFDH | *bsfdh* 基因插入载体 | 实验室保藏 |

## 2.2 试剂与仪器

本研究所使用主要试剂和仪器见表2-2和2-3。

表2-2 本研究所用主要试剂

Table 2-2 Main reagents used in this research

| 试剂 | 来源 |
|---|---|
| L-缬氨酸、L-苏氨酸、L-酪氨酸、L-脯氨酸、L-精氨酸，L-丝氨酸、盐酸、无水乙醇 | 中国医药集团上海化学试剂公司 |

续表 2-2 本研究所用主要试剂

Continued table 2-2 Main reagents used in this research

| | |
|---|---|
| 感受态试剂盒 | OMEGA Bio-Tek 公司 |
| 质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒 | 上海翊圣生物科技有限公司 |
| DL5,000 DNA Marker、DL1,0000 DNA Marker | Invitrogen |
| xProtein SDS PAGE Loading Buffer | TCI（上海）化成工业发展有限公司 |
| 卡那霉素、链霉素 | 上海生工生物工程有限公司 |
| 酵母粉、蛋白胨 | Oxoid 公司 |
| 10% SDS-PAGE 预制胶、4×上样缓冲液、20×电泳缓冲液 | 上海麦克林生化科技有限公司 |
| Premixed Protein Marker | 百灵威有限公司 |

表2-3 本研究所用主要仪器

Table 2-3 Main experimental instruments used in this research

| 仪器及型号 | 厂家 |
|---|---|
| 单人超净台 | 苏州安泰空气技术公司 |
| DNA电泳装置 | 奥豪斯仪仪器有限公司 |
| 超纯水仪SYNERGY | Millipore |
| 酶标仪CYTATION3 | BioTek |
| GE HisTrap HP亲和层析柱 | GE Healthcare |
| 超声波细胞破碎仪 | 南京新辰生物科技 |
| 多功能摇床HL-D | 太仓强乐实验设备有限公司 |
| 冷冻离心机Avanti J-E | Eppendorf |
| 医用冰箱 | 海尔兄弟 |
| 蛋白电泳仪、PCR仪 | Eppendorf |
| 离心机 5420 | 上海卢湘仪离心机仪器有限公司 |
| 麦斯诺96孔酶标板 | 致微（厦门）仪器公司 |
| 灭菌锅SX-400 | Tony |
| 分析天平AL100 | METTLER TOLEDO |

续表 2-3 本研究所用主要仪器

Continued table 2-3 Main instruments used in this research

| | |
|---|---|
| 超低温冰箱 | METTLER TOLEDO |
| 分光光度计 | METTLER TOLEDO |
| 电子天平 GK400 | METTLER TOLEDO |
| 高效液相色谱 CM5110 | 日立 |

## 2.3 培养基与溶液

LB 液体培养基：胰蛋白胨10 g·L$^{-1}$、酵母粉5 g·L$^{-1}$、NaCl 10 g·L$^{-1}$。

LB 固体培养基：胰蛋白胨10 g·L$^{-1}$、酵母粉5 g·L$^{-1}$、NaCl 10 g·L$^{-1}$、琼脂粉40 g·L$^{-1}$。

以上培养培养基在培养载有pET-28a 重组质粒的菌株时加入50 μg·mL$^{-1}$的卡那霉素。

蛋白染色液：考马斯亮蓝R-250 1 g、乙酸100 mL、甲醇450 mL、去离子水450 mL，均匀混合。

蛋白纯化液 A：Tris 20 mM，NaCl 150 mM，用 HCl 调至 pH 7.5。

蛋白纯化缓 B：Tris 20 mM，NaCl 150 mM，咪唑 500 mM，用 HCl 调至 pH 7.5。

破碎细胞缓冲液：Tris 25 mM，用 HCl 调至 pH 7.5。

FDAA 衍生剂：5 mL 丙酮溶解 40 mg 1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸酰胺。

## 2.4 L-氨基酸脱氨酶和D-氨基酸脱氢酶的检测

### 2.4.1 重组菌株的蛋白表达

将实验室保藏的重组菌以平板划线法接种至2 mL含有1%卡那霉素的LB液体培养基中，在37°C下200 r/min震荡培养6-8 h。将处于生长对数期的菌液后以2%的接种量转接种子液至50 mL含有1%卡那霉素的250 mL锥形瓶中，在37°C的条件下震荡培养2-2.5 h，加入终浓度为0.5 mmol·L$^{-1}$的IPTG，在17 °C、200 r·min$^{-1}$的诱导条件下培养14 h。

### 2.4.2 细胞破碎

在10000 rpm、4°C条件下离心10 min发酵液，收集菌体沉淀，用生理盐水重悬并洗

涤两遍，加入25 mL的50 mM Tris-HCl缓冲液（pH 7.5），在冰水浴静置，超声破碎，功率300 w，超声2 s，暂停2 s。每个样品超声25 min至菌液微透明。在4°C、10000 rpm条件下离心25 min，上清液用0.22 μm水系滤膜过滤，用于蛋白纯化。

### 2.4.3 蛋白纯化

（1）镍柱纯化：使用蛋白纯化仪 AKTA Avant 25，平衡 GE HisTrap HP 亲和层析柱，将过滤后的酶液以低流速上样，再用缓冲液 A 洗将柱子冲平衡，通过混合不同浓度的缓冲液 A 和 B，洗脱杂蛋白和带有组氨酸标记的目的蛋白，并且收集洗脱峰。收集到的酶置于冰上，即时脱盐。可以通过 SDS-PAGE 判断是否收集到目的蛋白并检测纯度。

（2）凝胶柱脱盐：用 2 mL 超纯水平衡 GE PD-10 Columns 凝胶柱三次，操作按照说明书，上样 2 mL 收集到的目的蛋白样品，加入 3.5 mL 低盐缓冲液 C 进行洗脱，收集目的蛋白。再用 3 mL 低盐缓冲液 C 洗脱咪唑 3-4 次，确保咪唑完全洗脱下来。收集到的蛋白要在-80℃冰箱保存，用于后续反应。

### 2.4.4 模块催化反应

为了确保多酶级联反应中每个模块酶催化的反应都是单向进行，并且检测反应系统中各组分对酶的影响，需要单独对每个模块的反应进行检测。

（1）L-氨基酸脱氨酶：分别以 20 mM HPPA、20 mM L-Ser、20 mM D-Ser 为底物，在含有 0.2 $g \cdot mL^{-1}$ PmirLAAD 全细胞的 2 mL Tris-HCl 缓冲液（20 mM , pH 9.5）溶液中反应 10 h。将 20 mM HPPA、20 mM L-Ser、20 mM D-Ser 加入到 2 mL 不添加酶的相同溶液中作为对照组。每个反应设置 3 组平行实验。反应温度为 42℃，每隔 2 h 取 50 μL 反应液作为样品进一步分析。

（2）D-氨基酸脱氢酶：分别以 HPPA、L-Ser、D-Ser 为底物进行检测。当以 HPPA 为底物（终浓度 20 mM）时，在含有 4 $mg \cdot mL^{-1}$ 的 StDAPDH/H227V、40 mM $NH_4Cl$ 和 10 mM NADPH 的 2 mL Tris-HCl 缓冲液（20 mM , pH 9.5）溶液中反应 10 h。将 20 mM HPPA 加入到 2 mL 不加纯酶的相同溶液中作为对照组。以 D-Ser 或 L-Ser 为底物（终浓度 20 mM）时，在含有 4 $mg \cdot mL^{-1}$ StDAPDH/H227V 纯酶、40 mM $NH_4Cl$ 和 10 mM $NADP^+$的 2 mL Tris-HCl 缓冲液（20 mM , pH 9.5）溶液中反应 10 h。将 20 mM D-ser 和 L-ser 分别加入到 2 mL 不含纯酶的相同溶液中作为对照组。每

反应设置 3 个平行实验。反应温度为 42℃，每隔 2 h 取 50 μL 反应液作为样品进一步分析。

### 2.4.5 D-丝氨酸和 L-丝氨酸的检测

LAAD 的活性可以通过检测底物 L-Ser 的消耗来确定。D-氨基酸脱氢酶的活性可以通过检测 D-Ser 的生成来确定。L,D-Ser 可以通过高效液相色谱法（HPLC）来检测。在反应液上样之前，需进行衍生化处理。

D-Ser 和 L-Ser 的衍生化方法：5 mL 丙酮溶解 40 mg 的 1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸酰胺，配置成衍生溶液。5 μL 反应液加入到 Ep 管中，再添加 4 μL 的 1M $NaHCO_3$ 溶液和 20 μL 的 1% FDAA 丙酮溶液，40℃金属浴温热 1 h，取出冷却至室温，加入 4 μL 的 1M 盐酸终止反应，利用 0.22 μm 有机滤膜过滤，作为用于高效液相检测的样品。

D-Ser 和 L-Ser 的液相检测方法：采用日立 CM1550 高效液相色谱和 Develosil ODS-UG-5 column（150 mm×4.6 mm），柱温箱 38℃，流动相 A 为水（含有 0.05%三氟乙酸），流动相 B 为乙腈（含有 0.05%三氟乙酸），检测波长 345 nm，柱子冲平衡后，样品进样量 20 μL，每个样品检测时间 40 min，0-35 min 内流动相 B 比例由 15%提高到 45%，流速恒定 1 $mL \cdot min^{-1}$。D-Ser 的保留时间为 30.5 min，L-Ser 的保留时间为 27.3 min。

### 2.4.6 羟基丙酮酸的检测方法

为了进一步确定 PmLAAD 对 L-丝氨酸有催化活性，不仅要检测底物的消耗，还要检测产物的生成。羟基丙酮酸能够与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸-2,4-二硝基苯腙，在碱性溶液中进一步被氧化为棕红色物质，产物在 520 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化即可定量检测丙酮酸的含量。

## 2.5 StDAPDH/H227V的分子改造

### 2.5.1 StDAPDH/H227V的分子建模和对接

利用 SWISS-MODEL 在线服务器（https://swissmodel.expasy.org/interactive）,基于 StDAPDH 蛋白结构（PDB ID : 3WBB）构建 StDAPDH/H227V 及其突变体的同源结构模型。HPPA 和 NADPH 的结构下载自 PubChem (https://pubchem.

ncbi.nlm.nih.gov)。利用 AutoDock 将 HPPA 与 StDAPDH/H227V 受体进行对接。利用 PyMOL 分析其结构并鉴定潜在的结合位点。

### 2.5.2 StDAPDH/H227V的饱和突变

利用 Pymol 进行分子对接，预测出了 StDAPDH/H227V 口袋中的四个关键残基，利用同源重组的方法对这四个位点进行饱和突变，设计的突变质粒如下（由上海生工合成）。

表 2-4 StDAPDH/H227V 单点饱和突变的引物

Table 2-4 Primers used for StDAPDH/H227V single-site saturation mutagenesis

| 引物名称 | 引物序列(5’-3’) |
|---|---|
| 152G-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGGGCATGGGC |
| 152A-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGGCCATGGGC |
| 152V-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGGTCATGGGC |
| 152L-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGTTAATGGGC |
| 152I-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGATCATGGGC |
| 152W-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGTGGATGGGC |
| 152F-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGTTCATGGGC |
| 152P-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGCCCATGGGC |
| 152S-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGAGCATGGGC |
| 152T-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGACCATGGGC |
| 152C-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGTGCATGGGC |
| 152Y-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGTACATGGGC |
| 152N-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGAACATGGGC |
| 152Q-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGCAAATGGGC |
| 152D-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGGACATGGGC |
| 152E-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGGAAATGGGC |
| 152K-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGAAGATGGGC |
| 152R-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGAGAATGGGC |
| 152H-F | TTACACAAACTTTGGCCCCGGCATGCACATGGGC |
| 152-R | CGGGGCCAAAGTTTGTGTAAGTAATTCCCTTGGG |
| 92G-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCGGATCAGTAG |
| 92A-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCGCATCAGTAG |
| 92V-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCGTATCAGTAG |
| 92L-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCTTATCAGTAG |
| 92I-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCATATCAGTAG |

续表 2-4 StDAPDH/H227V 单点饱和突变的引物

Continued table 2-4 Primers used for StDAPDH/H227V single-site saturation mutagenesis

| | |
|---|---|
| 92N-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCAACTCAGTAG |
| 92Q-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCCAATCAGTAG |
| 92E-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCGAATCAGTAG |
| 92K-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCAAGTCAGTAG |
| 92R-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCCGCTCAGTAG |
| 92H-F | CTTTGGCCCCGGCATGTCCATGGGCCACTCAGTAG |
| 92-R | TGGACATGCCGGGGCCAAAGTTTGTGTAAG |
| 253G-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGGGACTAGGCC |
| 253A-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGGCCCTAGGCC |
| 253V-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGGTCCTAGGCC |
| 253L-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGTTACTAGGCC |
| 253I-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGATCCTAGGCC |
| 253M-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGATGCTAGGCC |
| 253W-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGTGGCTAGGCC |
| 253F-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGTTCCTAGGCC |
| 253P-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGCCCCTAGGCC |
| 253S-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGAGCCTAGGCC |
| 253T-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGACCCTAGGCC |
| 253C-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGTGCCTAGGCC |
| 253Y-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGTCCCTAGGCC |
| 253Q-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGCAACTAGGCC |
| 253D-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGGCACTAGGCC |
| 253E-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGGAACTAGGCC |
| 253K-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGAAGCTAGGCC |
| 253R-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGGAGCTAGGCC |
| 253H-F | TGCCCAATGCATACCTTTGGGATCGCACCTAGGCC |
| 253-R | GTTCAGCCCCGATTATCATTCGCGTACCCG |
| 122G-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAGGATAACGGC |
| 122A-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAGCCTAACGGC |
| 122V-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAGTCTAACGGC |
| 122L-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAATTATAACGGC |
| 122I-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAATCTAACGGC |
| 122M-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAATGTAACGGC |
| 122W-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAATGGTAACGGC |

续表 2-4 StDAPDH/H227V 单点饱和突变的引物

Continued table 2-4 Primers used for StDAPDH/H227V single-site saturation mutagenesis

| | |
|---|---|
| 122F-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAATTCTAACGGC |
| 122P-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAACCCTAACGGC |
| 122S-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAAGCTAACGGC |
| 122T-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAACCTAACGGC |
| 122C-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAATGCTAACGGC |
| 122Y-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAATCCTAACGGC |
| 122N-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAAACTAACGGC |
| 122Q-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAACAATAACGGC |
| 122E-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAGAATAACGGC |
| 122K-F | GCTTAGACAAACGTTGCCAGCTAAAAGTAACGGC |

通过 PCR 将含有突变位点的目的基因扩增出来，体系如下：

| | |
|---|---|
| pET28a-StDAPDH/H227V | 0.5 μL |
| Primer F | 0.5 μL |
| Primer R | 0.5 μL |
| PrimeSTAR MAX DNA Polymerase | 25 μL |
| 超纯水 | 23.5 μL |

扩增的具体操作参照 PrimeSTAR® MAX DNA Polymerase 的三步 PCR 反应条件进行。扩增程序设置：在 95℃下预变性 10 min，进行 35 个循环，每个循环 95℃持续 35 s，在 60℃复性 5 s，74℃延伸。

扩增结束后，在 1 mL 的 5×Loading Buffer 中加入 2 mL 扩增结束的产物，电泳检测结果。往 20 mL 1%琼脂凝胶糖加入 1.5 mL 的 Goldview，TAE 缓冲液稀释 10 倍后使用，电泳电压 200 V，电流 20 mA，持续 20 min，结束后用成像仪拍照观察。

扩增产物的回收和重组连接：验证成功后利用 DNA Clean-up Kit 试剂盒对 PCR 扩增产物进行回收，步骤如下：

（1）回收正确的酶切产物，当跑胶结束后，在紫外灯的照射下用干净刀片将目的片段切下，胶块宽度 2cm 左右，注意不能将胶切断，并且切面要尽量平整，不要触碰到相邻条带。

（2）在切好的胶块下垫塑料手套，放置在回收槽里，加入低熔点琼脂糖胶，2min 后将其重新放回电泳槽进行电泳。在移动胶时动作要小心，回收胶块和低熔点琼脂糖胶的交界面容易裂开。

（3）等目的条带成功跑入低熔点琼脂糖胶后，在紫外灯的照射下用干净的刀片将含有目的基因的凝胶条带完全切下，放到一个灭菌过的新的 1.5 mL Eppendorf 管中，加入 250 μL 的 TE 溶液。

（4）将胶块放置到 50℃的水浴中，使其完全融化。

（5）往 Eppendorf 管中加入 250-300 μL 的 Tris-HCl（pH 9.0），轻轻摇晃 1 min，在 10000 rpm 的条件下离心 3 min。

（6）将上层溶液移至新的灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管中，加入 3 倍体积的无水乙醇，在 10000 rpm 的条件下离心 10 min，注意在移动水相时要小心操作，不能吸入沉淀和杂质。

（7）迅速弃上清，用 200 μL 无水乙醇洗涤管底的沉淀物，重复 2 次，洗涤后将 Eppendorf 管置于恒温器上干燥（55℃）5~10 min 至无乙醇气味，再加入 20 μL 超纯水溶解。

（8）取 20 μL 电泳定量后－20℃储存备用。

PCR 产物纯化步骤如下：

（1）往扩增后的产物中加入 3 倍体积的 Buffer PB，缓慢吹吸至混匀。

（2）吸附柱装上 5 mL 收集管，往柱子中加入 150 mL Buffer PS，12000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中液体。

（3）将（1）得到的混合液加入到吸附柱中，25℃静置 3 min，12000 rpm 离心 3 min，倒掉收集管中液体。

（4）往柱中加入 400 mL Buffer PW，12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中液体。

（5）12000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中液体。

（6）在 55℃下预热灭菌超纯水，5 min 后加入到吸附柱中，12000 rpm 离心 2 min，收集管中液体，需要在-4℃冰箱保存。

对纯化后的 PCR 产物进行双酶切，反应体系如下：

| | |
|---|---|
| QuickCut 1 | 1 mL |
| QuickCut 2 | 1 mL |
| 5×QuickCut Buffer | 2 mL |

双酶切产物的纯化步骤：

将双酶切产物转移至干净的 1.5 mL 离心管中，加入 4-5 体积的 Buffer CP，吹吸混合，再将样品加入到组装了 2 mL 收集管的 HiBind ® DNA 自旋柱上，并在室温下 10000 rpm 离心 1 min，弃去上清液。重新使用收集管，用无水乙醇稀释的 DNA Wash Buffer 洗柱，在 10000 rpm 的条件下离心 1 min。DNA Wash Buffer 浓缩液使用前必须用无水乙醇稀释，参考瓶子上的标签进行说明。弃去液体，用 DNA Wash Buffer 重复，弃去液体，将空柱离心 1 min，干燥柱基质。将柱子放入干净的 1.5 mL 微量离心管中，向柱基质中直接加入 30 mL 无菌水。

大肠杆菌感受态细胞的制备具体步骤如下：

（1）受体菌的培养：在划有受体菌的 LB 平板上挑取单菌落，接种在 4 mL 的无抗性 LB 液体培养基中，在 37℃的条件下振荡培养 10 h，达到对数生长期。将菌液以 2%的量接种在 50 mL 的无抗性 LB 液体培养基中，在 37℃的条件下振荡培养 4h，直到 $OD_{600}$ 达到 0.6 左右。

（2）感受态细胞的制备（$CaCl_2$ 法）；将培养好的菌液转移到离心管中，冰浴 15 min 后，在 4℃、2500 rpm 的条件下离心 15 min，弃去上清液，添加预冷过的 0.05 mol/L 的 $CaCl_2$ 溶液 15 mL，轻轻吹吸，使细胞悬浮，冰浴 20-30 min 后，在 4℃、3000 rpm 的条件下离心 15 min，弃去上清液，加入 5 mL 预冷过的含有 20%甘油的 $CaCl_2$ 溶液，轻轻吹吸，使细胞悬浮，冰浴 10 min 后得到感受态细胞的悬液。在无菌条件下，将感受态细胞悬液分装到 Eppendorf 管中，,贮存在-80℃冰箱中，需要时取出。

（3）转化：将分装后的感受态细胞悬液从-80℃冰箱中取出，在室温下解冻 2 min 后放置在冰盒中，加入 10 μL 的质粒溶液，轻轻晃动，在冰上静置大约 20 min 后，在 37℃的条件下水浴 5 min 或者在 42℃的水浴中热击 90 s，之后迅速置于冰盒中 5 min。向 Eppendorf 管中加入 1 mL 的无抗的 LB 培养基，吹吸混匀，在 37℃的条件下振荡培养 1 h 左右，使菌体正常生长。将培养好的菌液在 5000 rpm 的条件下离心 2 min，倒掉大部分上清液。剩余上清液与菌体混匀，涂布到含有 Kann 的 LB 平板上，在 37℃的条件下倒置培养 24 h。同时设置两个对照组，第一个对照组为涂布有同体积无菌水的含有 Kann 的 LB 平板，第二个对照组为涂布有少量菌液的无抗性 LB 平板。正常情况下，前者没有菌落生成，后者有菌落生成。

（4）挑选平板上的单菌落进行验证。

### 2.5.3 筛选突变体的高通量方法

96-MTPs 每孔加入 2 mL 粗酶液、HPPA（$1.34\times10^{-2}$ g）、NADPH（$6.23\times10^{-2}$ g）、$NH_4Cl$（质量分数 35% , $9.78\times10^{-2}$ g），取 100 μL 混合液，记录其荧光强度作为初始荧光。然后将混合物在 37℃和 200 rpm 的旋转振荡器上反应 12 h。从每孔中取出 100 mL 反应液，加入到含有 100 mL 的 Tris-Cl 缓冲液（pH 9.5 , 50 mM）和 60 mL 的 Cu(II)钙复合物的黑色 96-MTP 孔中。30 min 后，在激发波长 485 nm 和发射波长 525 nm 处检测各孔中混合物的荧光强度。

### 2.5.4 筛选动力学参数的测定

酶动力学参数测定：PmLAAD 酶动力学参数测定：羟基丙酮酸能够与 2,4-二硝基苯肼反应产生红棕色。在 37℃条件下，往 60 mM Tris-HCl 缓冲溶液（pH 9.5）中加入 5 g 的 PmLAAD 全细胞，加入反应产生 60 mM 底物 L-丝氨酸，总体系 5 mL，反应 1 h 后 10000 rpm 离心 3 min，取 20 μL 上清液加入到 1 mL 的 2,4-二硝基苯肼溶液中，在 40℃下反应 5 min，检测其在 545 nm 处的吸光度。PmLAAD 酶活单位 U 定义为：在该反应条件下，每分钟生成 1 μmol 的羟基丙酮酸所需要的酶量。

DAPDH 酶动力学参数测定：DAPDH 的酶活通过检测辅酶 NADPH 的消耗来测定。NADPH 的吸光度可以在 340 nm 处被检测到。往 50 mM $Na_2CO_3$-$NaHCO_3$ 缓冲液（pH 9.5）中加入 100 mM $NH_4Cl$、1 mM NADPH，底物羟基丙酮酸浓度分别选择 1 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、35 mM、45 mM、55 mM 和 100 mM，加入 20 μL 纯酶，在 37℃下进行反应，立马使用 Spectramax 酶标仪检测其在 340 nm 处吸光值。通过莱恩威弗图计算 DAPDH 还原胺化的动力学参数值。酶活（U）＝ $V\times EW\times10^3$/（6220×0.3）。

FDH 酶动力学参数测定：往 50 mM $Na_2CO_3$-$NaHCO_3$ 缓冲液（pH 9.5）中加入 1 mM $NADP^+$，底物甲酸钠浓度分别选择 1 mM、5 mM、8 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM，加入 20 μL 纯酶，在 37℃下进行反应，立刻使用酶标仪检测其在 340 nm 处的吸光度。通过莱恩威弗图计算 BsFDH 的动力学参数值。酶活（U）= $V\times EW\times10^3$/（6220×0.3）。

## 2.6多酶级联体系的组装

### 2.6.1级联催化反应中各催化剂的组合

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：https://d.book118.com/446014113003010054