

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019 年 6 月 27 日 (27.06.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/119614 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 13/20 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/074337
- (22) 国际申请日: 2018 年 1 月 26 日 (26.01.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
2017111374147.7 2017 年 12 月 19 日 (19.12.2017) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 周哲敏(ZHOU, Zhemin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 余龙(YU, Long); 中国江苏省无锡市蠡湖大道

1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 周丽(ZHOU, Li); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 崔文璟(CUI, Wenjing); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 刘中美(LIU, Zhongmei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 郭军玲(GUO, Junling); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理事务所(普通合伙)(CENTRAL SOUTH WELL INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江苏省苏州市工业园区金芳路 18 号 B3 幢二层 214 室, Jiangsu 215000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

(54) Title: METHOD FOR SYNTHESIZING L-ASPARTIC ACID BY MEANS OF WHOLE CELL CATALYSIS OF MALEIC ACID BY COUPLING TWO ENZYMES

(54) 发明名称: 一种双酶偶联全细胞催化马来酸合成L-天冬氨酸的方法

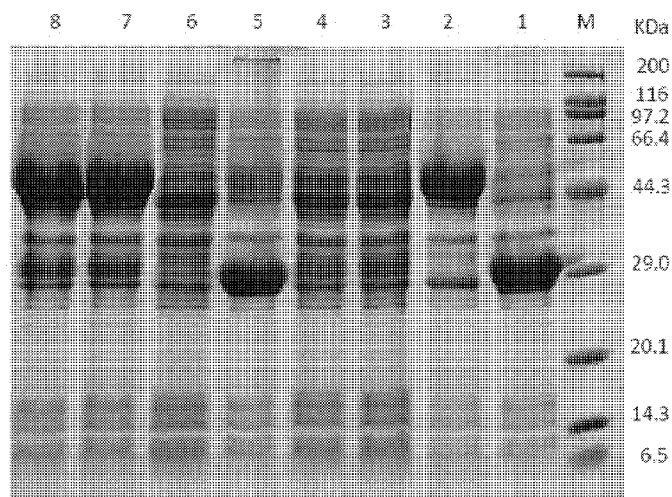


图 3

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is a method for synthesizing L-aspartic acid by means of the whole cell catalysis of maleic acid by coupling two enzymes, which relates to the field of bio-engineering. In the present invention, a recombinant strain that coupledly expresses a cis-trans isomerase of maleic acid and L-aspartate lyase is constructed, and the recombinant strain is further modified and optimized to obtain a recombinant bacterial strain which may perform whole cell high-conversion rate catalysis of maleic acid to generate L-aspartic acid. The recombinant strain may produce L-aspartic acid by using maleic acid which is relatively inexpensive; after reacting for 40-120 min, the maleic acid has completely reacted, and almost none of the intermediate product of fumaric acid has accumulated, wherein the conversion rate may reach 98% or higher.



WO 2019/119614 A1

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 本发明公开了一种双酶偶联全细胞催化马来酸合成L-天冬氨酸的方法, 属于生物工程领域。本发明构建了一种偶联表达马来酸顺反异构酶和L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株, 并对该重组菌株进行改造优化, 获得能够全细胞高转化率催化马来酸生成L-天冬氨酸的重组菌。该重组菌株能够利用价格相对便宜的马来酸生成L-天冬氨酸, 反应40~120min, 马来酸反应完全, 而且几乎没有中间产物富马酸的积累, 转化率到达98%以上。

一种双酶偶联全细胞催化马来酸合成 L-天冬氨酸的方法

技术领域

本发明涉及一种双酶偶联全细胞催化马来酸合成 L-天冬氨酸的方法,属于生物工程领域。

背景技术

L-天冬氨酸(L- aspartic acid)是构成蛋白质的 20 种基础氨基酸之一。其在食品、医药、化工等领域都有着广泛的应用和较大的市场开发潜力。

目前,工业生产 L-天冬氨酸的工艺主要是以顺丁烯二酸酐为原料,在无机催化剂、强酸性(pH=1 左右)条件下转化成富马酸;分离纯化获得富马酸,然后富马酸与过量的氨在 L-天冬氨酸裂解酶催化下转化生成 L-天冬氨酸铵,反应液用硫酸中和过量的氨后,分离纯化得到产品 L-天冬氨酸。此工艺虽然流程简单,但是其缺点明显:需要在高温、高压、过渡金属催化剂及强酸性条件下进行,对设备的要求严格,造成的环境污染严重,同时需要分离纯化中间产物富马酸,会造成产率的下降等。相比较而言,双酶偶联全细胞催化转化法具有专一性强,转化率高、工艺简洁、设备投资少及环境污染小等优点,因此双酶偶联全细胞催化转化法具有更好的应用前景。

目前,关于双酶偶联全细胞催化马来酸合成 L-天冬氨酸的研究还较少,大多数都还是停留在以富马酸为底物的研究基础上,主要原因受限于马来酸顺反异构酶的稳定性差、酶活低、难以异源表达。

发明内容

为了解决上述技术问题,本发明的目的是提供一种双酶偶联全细胞催化马来酸合成 L-天冬氨酸的方法,提供了一种偶联表达马来酸顺反异构酶(粘质沙雷氏菌来源)和 L-天冬氨酸裂解酶(大肠杆菌来源)的重组菌株,并对该重组菌株进行改造优化,获得能够全细胞高转化率催化马来酸生成 L-天冬氨酸的重组菌。

本发明采用的技术方案如下:

在一方面,本发明提供了一种制备 L-天冬氨酸的方法,以偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株或该重组菌株产生的酶为催化剂,以马来酸为底物,生成 L-天冬氨酸。

在本发明的一种实施方式中,偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株,是以大肠杆菌为宿主,表达以 pRSFDuet-1 为表达载体构建的重组表达载体 pRSFDuet-1-maiA-aspA。

在本发明的一种实施方式中，马来酸顺反异构酶来源于粘质沙雷氏菌，L-天冬氨酸裂解酶来源于大肠杆菌。

在本发明的一种实施方式中，大肠杆菌是敲除了基因组中 *fum A-fum C* 基因的 *E. coli BL21* (DE3) Δ *fumAC*。

在本发明的一种实施方式中，编码马来酸顺反异构酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

在本发明的一种实施方式中，编码所述 L-天冬氨酸裂解酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述马来酸顺反异构酶 SEQ ID NO.2 中的第 27 位的甘氨酸突变为丙氨酸并且第 171 位的甘氨酸突变为丙氨酸；或者 SEQ ID NO.2 中第 27 位的甘氨酸突变为丙氨酸并且第 104 位的赖氨酸突变为精氨酸。

在本发明的一种实施方式中，还在 SEQ ID NO.4 基础上将编码 L-天冬氨酸裂解酶的基因的 RBS 序列替换为 SEQ ID NO.23 或 SEQ ID NO.24 或 SEQ ID NO.25 所示的序列。

在本发明的一种实施方式中，是以 pH 8.0 的 2M 的马来酸溶液为底物，加入菌体浓度 OD₆₀₀ 为 40 的静息细胞悬液，静息细胞悬液与底物溶液的体积比为 2: 8。

所述方法在 pH 8.0 的 50 mM 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中进行，反应温度为 37°C。

在另一方面，本发明还提供了一株能高效偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株，以大肠杆菌为宿主，表达以 pRSFDuet-1 为表达载体构建的重组表达载体 pRSFDuet-1-*maiA*-*aspA*。

在本发明的一种实施方式中，大肠杆菌是敲除了基因组中 *fum A-fum C* 基因的 *E. coli BL21* (DE3) Δ *fumAC*。

在本发明的一种实施方式中，编码马来酸顺反异构酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

在本发明的一种实施方式中，编码所述 L-天冬氨酸裂解酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述马来酸顺反异构酶 SEQ ID NO.2 中的第 27 位的甘氨酸突变为丙氨酸并且第 171 位的甘氨酸突变为丙氨酸；或者 SEQ ID NO.2 中第 27 位的甘氨酸突变为丙氨酸并且第 104 位的赖氨酸突变为精氨酸。

在本发明的一种实施方式中，还在 SEQ ID NO.4 基础上将编码 L-天冬氨酸裂解酶的基因的 RBS 序列替换为 SEQ ID NO.23 或 SEQ ID NO.24 或 SEQ ID NO.25 所示的序列。

本发明的方法能够利用价格相对便宜的马来酸生成 L-天冬氨酸, 反应 40~120min, 马来酸反应完全, 而且几乎没有中间产物富马酸的积累, 转化率到达 98% 以上。

附图说明

图 1 为本发明 MaiA 与 AspA 偶联表达的不同策略;

图 2 为 PCR 扩增 maiA 和 aspA 基因及重组质粒的酶切验证结果: M: marker; 1: BamHI-maiA-HindIII 的 PCR 产物; 2: NdeI-maiA-XhoI 的 PCR 产物; 3: HindIII-maiA-XhoI 的 PCR 产物; 4: BamHI-aspA-HindIII 的 PCR 产物; 5: NdeI-aspA-XhoI 的 PCR 产物; 6: HindIII-aspA-XhoI 的 PCR 产物; 7: pRSF_{Duet-1}-maiA 重组质粒的双酶切验证; 8: pRSF_{Duet-1}-aspA 重组质粒的双酶切验证; 9: pET_{Duet-1}-maiA 重组质粒的双酶切验证; 10: pET_{Duet-1}-aspA 重组质粒的双酶切验证; 11: pET-28a(+)-maiA 重组质粒的双酶切验证; 12: pET-28a(+)-aspA 重组质粒的双酶切验证; 13: pRSF_{Duet-1}-aspA-maiA 重组质粒的双酶切验证; 14: pRSF_{Duet-1}-maiA-aspA 重组质粒的双酶切验证; 15: pET-28a(+)-maiA-aspA 重组质粒的双酶切验证; 16: pET-28a(+)-aspA-maiA 重组质粒的双酶切验证;

图 3 为不同偶联表达的 SDS-PAGE 结果: M: marker; 1: pRSF_{Duet-1}-maiA 表达结果; 2: pRSF_{Duet-1}-aspA 表达结果; 3: pMA 1 表达结果; 4: pAM 1 表达结果; 5: pMA 2 表达结果; 6: pAM 2 表达结果; 7: pMA 3 表达结果; 8: pAM 3 表达结果;

图 4 为 pMA 2 全细胞催化结果;

图 5 为 pMA 2 中的 MaiA 的 RBS 改造后 SDS-PAGE 结果: M: marker; 1: pMA 2 表达结果; 2: pMA 2-1 表达结果; 3: pMA 2-2 表达结果; 4: pMA 2-3 表达结果; 5: pMA 2-4 表达结果;

图 6 为 pMA 2-4 全细胞催化结果;

图 7 为 pMA 2-4 (G27A-G171A) 全细胞催化结果;

图 8 为 pMA 2-4 (G27A-K104R) 全细胞催化结果。

具体实施方式

马来酸、富马酸和 L-天冬氨酸的检测方法:

马来酸、富马酸和 L-天冬氨酸的浓度都用高效液相色谱 (HPLC) 法检测。马来酸、富马酸的 HPLC 检测条件: 色谱柱 Prevail Organic Acid (250 mm×4.6 mm, 5 μm; Grace Davison Discovery Sciences), 流动相为 pH 2.5、浓度 25 mM 的 K₂HPO₄ 溶液, 流速 1 mL/min, 柱温 40℃, 紫外检测器波长 210 nm, 进样量 10 μL。L-天冬氨酸的检测要先经过苯基异硫氰酸酯 (PITC) 进行衍生, 在其氨基端连接一个苯环, 便于分离。衍生方法为: 取 500 μL 反应液,

加入 250 μL 1 M 的三乙胺-乙腈溶液和 250 μL 0.1 M 的 PITC-乙腈溶液, 振荡混匀, 避光反应 1 h。待衍生结束后, 700 μL 正己烷, 振荡 30 s 萃取出残余的衍生试剂, 静置, 待反应液有明显分层后吸取下层溶液, 用 0.22 μm 针头式有机滤膜过滤。HPLC 检测条件: 色谱柱 La Chrom C18 (5 μm , 4.6mm $\times$ 250 mm), 用梯度洗脱的方法进行检测。A 流动相为 80% 的乙腈溶液, B 流动相为 97:3 的 0.1 M 乙酸钠-乙腈溶液; 梯度洗脱条件为: 0~35 min, B 流动相由 95% 降至 65%; 35~40 min, B 流动相由 65% 升至 95%; 40~45 min, B 流动相浓度不变。检测温度为 40°C, 检测波长为 254 nm。

实施例 1 构建偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株

1) 马来酸顺反异构酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示, 编码马来酸顺反异构酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示; L-天冬氨酸裂解酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示, 编码 L-天冬氨酸裂解酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。根据目的基因和载体, 选择酶切位点, 设计引物 (如表 1);

表 1 酶切连接引物设计

基因	引物名称	引物序列 (5' --- 3')	酶切位点
maiA	P1	TTTGGATCCGATGAGCAACCACTACCGCATCG	BamHI
	P2	TTTAAGCTTTCAATAAGCGCCGGACAGCAG	HindIII
	P3	TTTCATATGAGCAACCACTACCGCATCG	NdeI
	P4	TTTCTCGAGTCAATAAGCGCCGGACAGCAG	XhoI
	P5	TTTAAGCTTATGAGCAACCACTACCGCATCG	HindIII
aspA	P6	TTTGGATCCGATGTCAAACAACATTCGTATCGAAG	BamHI
	P7	TTTAAGCTTTTACTGTTTCGCTTTCATCAGTATAGCGT	HindIII
	P8	TTTCATATGTCAAACAACATTCGTATCGAAGAAG	NdeI
	P9	TTTCTCGAGTTACTGTTTCGCTTTCATCAGTATAGCGT	XhoI
	P10	TTTAAGCTTATGTCAAACAACATTCGTATCGAAG	HindIII

注: 下划线标出的为酶切位点

2) 分别以 pET-24a (+) -maiA 和 pET-28a (+) -aspA 为模板进行 PCR, 得到如图 2a 所示的带不同酶切位点的 maiA 和 aspA 基因片段: BamHI-maiA-HindIII、NdeI-maiA-XhoI、HindIII-maiA-XhoI、BamHI-aspA-HindIII、NdeI-aspA-XhoI、HindIII-aspA-XhoI;

3) 纯化 PCR 片段, 用对应的酶进行双酶切 2h, 也将对应的质粒载体 pRSF_{Duet-1}、pET_{Duet-1}、pET-28a(+) 用对应的双酶切 2h, 然后将酶切产物切胶回收纯化;

4) 用核酸定量仪测定回收后的基因和载体片段的浓度, 按基因片段: 载体片段=3:1 的比例混合, 再加 T₄ DNA 连接酶在 16°C 过夜连接;

5) 将连接产物转化到 JM109 的感受态细胞里, 然后涂布到载体相应的抗生素抗性的 LB

平板培养基上;

6) 先菌落 PCR 验证, 然后挑取单菌落到 5mL 的抗生素浓度为 50 μ g/mL 的 LB 液体试管培养基 (10g 蛋白胨、5g 酵母膏、10g NaCl 定容到 1L) 中, 37 $^{\circ}$ C、200rpm 培养 8h, 提质粒进行双酶切验证 (如图 2b 和 2c), 将验证正确的菌进行测序;

7) 将测序正确的重组质粒转化到表达宿主 *E. coli BL21* (DE3) Δ fumAC (*E. coli BL21* (DE3) Δ fumAC 的构建方法参见文章: 房月芹, 周丽, 周哲敏. 重组大肠杆菌全细胞转化马来酸高效合成富马酸[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(12):1323-1329.) 感受态细胞里, 然后涂布到载体相应的抗生素抗性的 LB 平板培养基上; 挑取单菌落得到六种偶联表达体系: pMA 1: pET-28a (+) -maiA-aspA; pAM 1: pET-28a (+) -aspA-maiA; pMA 2: pRSFDuet-1-maiA-aspA; pAM 2: pRSFDuet-1-aspA-maiA; pMA 3: pRSFDuet-1-maiA- pETDuet-1-aspA; pAM 3: pRSFDuet-1-aspA- pETDuet-1-maiA 6。

8) 挑取单菌落接种于 5mL 的抗生素浓度为 50 μ g/mL 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200rpm 培养 8 小时, 然后以 2% 的接种量转接到装有 50mL 的 2YT 培养基 (16g 蛋白胨、10g 酵母膏、5g NaCl 定容到 1L) 的 250mL 的摇瓶中, 抗生素浓度为 50 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C、200rpm 培养到 OD 为 0.8, 然后加终浓度为 0.2mmol/L 的 IPTG 在 20 $^{\circ}$ C 下诱导表达 20 小时;

9) 各取相同量的诱导表达细胞, 离心收集菌体, 再用 pH 8.0 的 50 mM 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液重悬细胞, 超声破碎得到粗酶液。SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白的表达情况 (如图 3), 当 MaiA 和 AspA 分别单独表达时, 其表达量都比较高, 而当其串联表达时, 其表达量都有相应的降低, 而且不同的串联方式, 两个酶的表达水平相差也较大。期中 pMA 1 和 pAM 1 的串联体系的两个酶的表达量都较低; pMA 2 的串联体系的 MaiA 表达较好, 而 AspA 的表达较低; pAM 2 的串联体系的两个酶几乎都没有表达; pMA3 和 pAM3 的串联体系的 AspA 的表达较好, 而 MaiA 的表达较低。取由各重组细胞生产得到的 100 μ L 粗酶液, 加入到 50 μ L 的 2M 的 pH 8.0 的马来酸铵溶液, 用 pH 8.0 的 50 mM 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液补充体系到 500 μ L, 在 40 $^{\circ}$ C 反应 10min, 然后再 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min, 离心取上清, 检测上清中马来酸、富马酸和 L-天冬氨酸的含量。如表 2, pMA 2 的串联体系的催化生成 L-天冬氨酸的效果最佳, 这是因为 AspA 的酶活比 MaiA 要高的多, 故此催化体系的限速因素是 MaiA 的总酶活, 因此当 MaiA 的表达量越高时, 催化效果越好。

表 2 重组菌粗酶催化 200mM 的马来酸比较

重组菌	底物（马来酸） mM	中间产物（富马酸） mM	终产物（L-天冬氨酸） mM
pMA 1	156.3	0.8	49.1
pAM 1	170.7	0.5	30.8
pMA 2	41.4	0.2	161.2
pAM 2	200	0	0
pMA 3	134.8	0.1	65.1
pAM 3	138.4	0.1	63.6

实施例 2 偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株全细胞 pMA 2 转化马来酸生成 L-天冬氨酸

首先配置 pH 8.0 的马来酸溶液，此过程用氨水调节马来酸的 pH 到 8.0。收集实施例 1 诱导表达的细胞 pMA 2，用 pH 8.0 的 50 mM 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液重悬细胞，稀释到 OD₆₀₀ 到 40，然后按 20%（体积比）的静息细胞和 80%（体积比）的底物马来酸混合，反应体系为 30mL，在 200r/min、37°C 的摇床中催化反应，每隔 20min 取样检测反应液中马来酸、富马酸和 L-天冬氨酸的含量。如图 4，在 120min 底物马来酸反应完，而且几乎没有中间产物富马酸的积累，转化率到达 98%以上。

实施例 3 MaiA 基因序列中的 RBS 改造

（1）通过 RBS Calculator 软件预测不同的起始翻译速率的 RBS 序列选择四个不同的翻译起始速率的 RBS 序列，设计引物（如表 2）；

表 2 MaiA 的 RBS 改造引物设计

RBS 翻译 起始速率	引物名称	引物序列（5' --- 3'）
90504.51	maiA-1up	<u>CGAAAATCCCTAAGGAGCTTAAGCAT</u> GGGCAGCAGCCATCACCATCATCAC C
	maiA-1down	<u>GCTTAAAGCTCCTTAGGGATTTCG</u> ATTAAAGTTAAACAAAATTATTCTACA GGGGAATTGTTATCCGCTC
212828.18	maiA-2up	<u>CATCACCGTTAGACGAGGAGGTATCCT</u> ATGGGCAGCAGCCATCACCATCAT CACC
	maiA-2down	<u>AGGATACCTCCTCGTCTAACGGTGATG</u> ATTAAAGTTAAACAAAATTATTTC TACAGGGGAATTGTTATCCGCTC
318342.84	maiA-3up	<u>AATACCTACTAAGGAGGTAAGCAT</u> GGGCAGCAGCCATCACCATCATCACC
	maiA-3down	<u>GCTTACCTCCTTAGTAGGGTATT</u> ATTAAAGTTAAACAAAATTATTCTACAG GGGGAATTGTTATCCGCTC
370978.54	maiA-4up	<u>GAACTCGAACATAGTCTTAAGGAGGTTCAA</u> ATGGGCAGCAGCCATCACCAT CATCACC
	maiA-4down	<u>TTGAACCTCCTTAAGACTATGTTTCGAGTTC</u> ATTAAAGTTAAACAAAATTATT TCTACAGGGGAATTGTTATCCGCTC

注：斜体下划线标出的为 RBS Calculator 预测的 RBS 序列

(2)以 pMA 2 为模板,通过全质粒 PCR 的方法替换 pRSFDuet-1-maiA-aspA 中 MaiA 的原始 RBS 序列,用 DpnI 酶对 PCR 产物进行过夜消化;

(3)将消化产物转化到 JM109 的感受态细胞里,然后涂布到带卡那霉素的 LB 平板培养基上;

(4)挑取单菌落进行测序,将正确突变的突变体重组质粒转化到表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) Δ fumAC 感受态细胞里,然后涂布到带卡那霉素的 LB 平板培养基上,获得四株 MaiA 的 RBS 的翻译起始速率不同的菌株: pMA 2-1、pMA 2-2、pMA 2-3、pMA 2-4;

(5)分别挑取单菌落接种于 5mL 的抗生素浓度为 50 μ g/mL 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200rpm 培养 8 小时,然后以 2%的接种量转接到装有 50mL 的 2YT 培养基(16g 蛋白胨、10g 酵母膏、5g NaCl 定容到 1L)的 250mL 的摇瓶中, 抗生素浓度为 50 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C、200rpm 培养到 OD 为 0.8,然后加终浓度为 0.2mmol/L 的 IPTG 在 20 $^{\circ}$ C 下诱导表达 20 小时;

(6)离心收集等量的菌体,再用 pH 8.0 的 50 mM 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液重悬细胞,超声破碎得到粗酶液, SDS-PAGE 验证 MaiA 的表达量,如图 5,随着 RBS 起始翻译速率的增加, MaiA 的表达量也逐渐增加, pMA 2-4 的表达量最高。接下来对 pMA 2-4 进行全细胞催化。

(7)配置 pH 8.0 的马来酸溶液,此过程用氨水调节马来酸的 pH 到 8.0。收集步骤 (5)诱导表达的 pMA 2-4 细胞,用 pH 8.0 的 50 mM 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液重悬细胞,稀释到 OD₆₀₀ 到 40,然后按 20%的静息细胞和 80%的底物马来酸铵混合,反应体系为 30mL,在 200r/min、37 $^{\circ}$ C 的摇床中催化反应,每隔 20min 取样检测反应液中马来酸、富马酸和 L-天冬氨酸的含量。如图 6,相同条件下 pMA 2-4 完全催化转化底物马来酸只需要 80min,且也几乎没有中间产物富马酸的积累,转化率也在 98%以上。

实施例 4 马来酸顺反异构酶的突变改造

(1)分别以 pET-24a (+) -maiA(G27A-G171A) 和 pET-24a (+) -maiA(G27A-K104R)为模板 PCR 获得突变体 maiA 基因片段 maiA(G27A-G171A)和 maiA(G27A-K104R)。

(2)参照实施例 1 步骤 2~9 构建并诱导培养重组菌;参照实施例 2 进行全细胞反应。

G27A-G171A 在 55 $^{\circ}$ C 的半衰期是野生型的 2.9 倍,酶活是野生型的 1.96 倍, G27A-K104R 在 55 $^{\circ}$ C 的半衰期是野生型的 4.18 倍,酶活是野生型的 1.59 倍。结果如图 7,相比实施例 3, pMA 2-4(G27A-G171A) 完全催化转化底物马来酸只需要 40min,且也几乎没有中间产物富马酸的积累,转化率也在 98%以上;图 8,相同条件下 pMA 2-4(G27A-K104R) 完全催化转化底

物马来酸只需要 60min，且也几乎没有中间产物富马酸的积累，转化率也在 98%以上。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1、一种制备 L-天冬氨酸的方法，其特征在于，以偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株或该重组菌株产生的酶为催化剂，以马来酸为底物，生成 L-天冬氨酸。

2、根据权利要求 1 所述的一种制备 L-天冬氨酸的方法，其特征在于，所述偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株，是以大肠杆菌为宿主，表达以 pRSFDuet-1 为表达载体构建的重组表达载体 pRSFDuet-1-maiA-aspA。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的一种制备 L-天冬氨酸的方法，其特征在于，马来酸顺反异构酶来源于粘质沙雷氏菌，L-天冬氨酸裂解酶来源于大肠杆菌。

4、根据权利要求 3 所述的一种制备 L-天冬氨酸的方法，其特征在于，所述大肠杆菌是敲除了基因组中 *fum A-fum C* 基因的 *E. coli BL21* (DE3) Δ *fumAC*。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的一种制备 L-天冬氨酸的方法，其特征在于，编码所述马来酸顺反异构酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，或者 SEQ ID NO.2 中第 27 位的甘氨酸突变为丙氨酸并且第 171 位的甘氨酸突变为丙氨酸，或者 SEQ ID NO.2 中第 27 位的甘氨酸突变为丙氨酸并且第 104 位的赖氨酸突变为精氨酸。

6、根据权利要求 1 或 2 所述的一种制备 L-天冬氨酸的方法，其特征在于，编码所述 L-天冬氨酸裂解酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

7、根据权利要求 6 所述的一种制备 L-天冬氨酸的方法，其特征在于，编码 L-天冬氨酸裂解酶的基因的 RBS 序列替换为 SEQ ID NO.23 或 SEQ ID NO.24 或 SEQ ID NO.25 所示的序列。

8、根据权利要求 1 所述的一种制备 L-天冬氨酸的方法，其特征在于，以 pH 8.0 的 2M 的马来酸溶液为底物，加入重组菌株菌体浓度 OD₆₀₀ 为 40 的静息细胞悬液，静息细胞悬液与底物溶液的体积比为 2: 8。

9、一种偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株，其特征在于，以大肠杆菌为宿主，表达以 pRSFDuet-1 为表达载体构建的重组表达载体 pRSFDuet-1-maiA-aspA。

10、根据权利要求 9 所述的偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株，其特征在于，所述大肠杆菌敲除了基因组中 *fum A-fum C* 基因的 *E. coli BL21* (DE3) Δ *fumAC*。

11、根据权利要求 9 或 10 所述的偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株，其特征在于，编码所述马来酸顺反异构酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，或者 SEQ ID NO.2 中第 27 位的甘氨酸突变为丙氨酸并且第 171 位的甘氨酸突变为丙氨酸，或者 SEQ ID NO.2 中第 27 位的甘氨酸突变为丙氨酸并且第 104 位的赖氨酸突变为精氨酸。

12、根据权利要求 9 或 10 所述的偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重

组菌株,其特征在于,编码所述 L-天冬氨酸裂解酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

13、根据权利要求 12 所述的偶联表达马来酸顺反异构酶和 L-天冬氨酸裂解酶的重组菌株,其特征在于,编码 L-天冬氨酸裂解酶的基因的 RBS 序列替换为 SEQ ID NO.23 或 SEQ ID NO.24 或 SEQ ID NO.25 所示的序列。

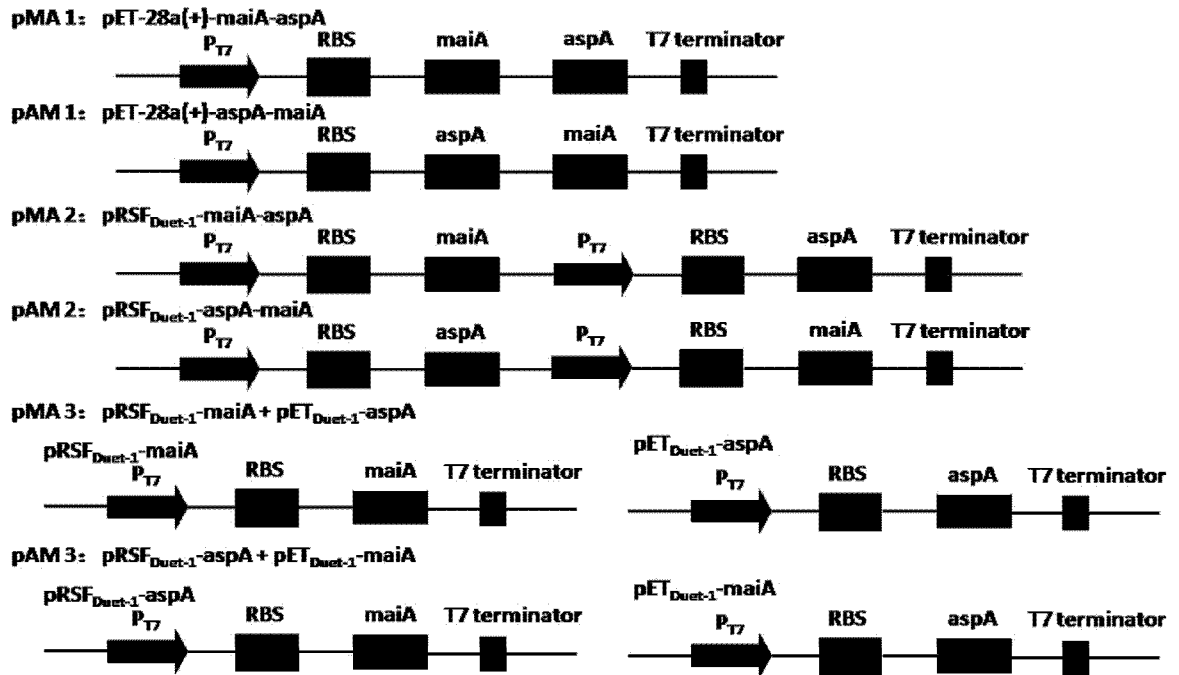


图 1

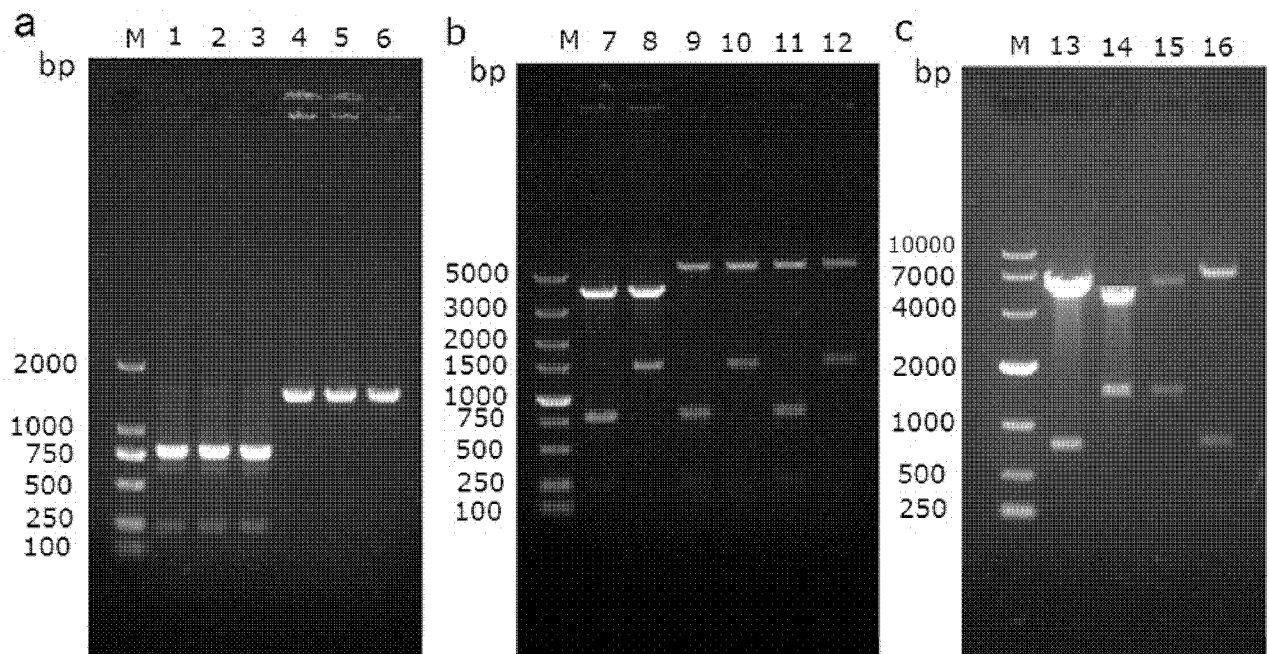


图 2

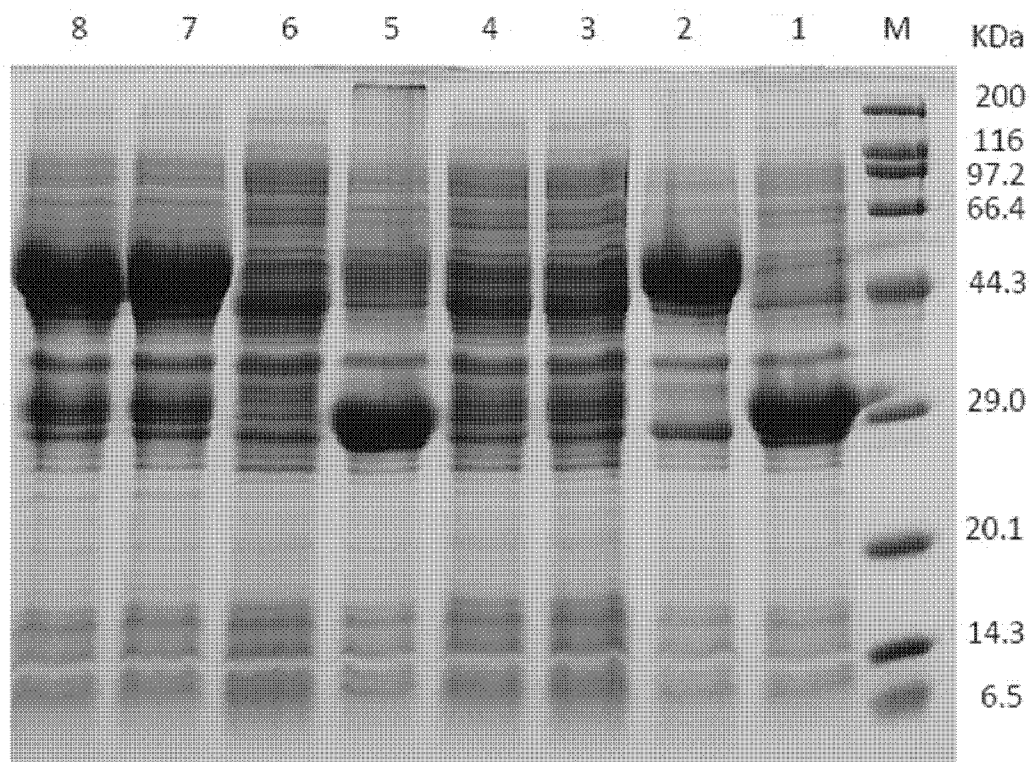


图 3

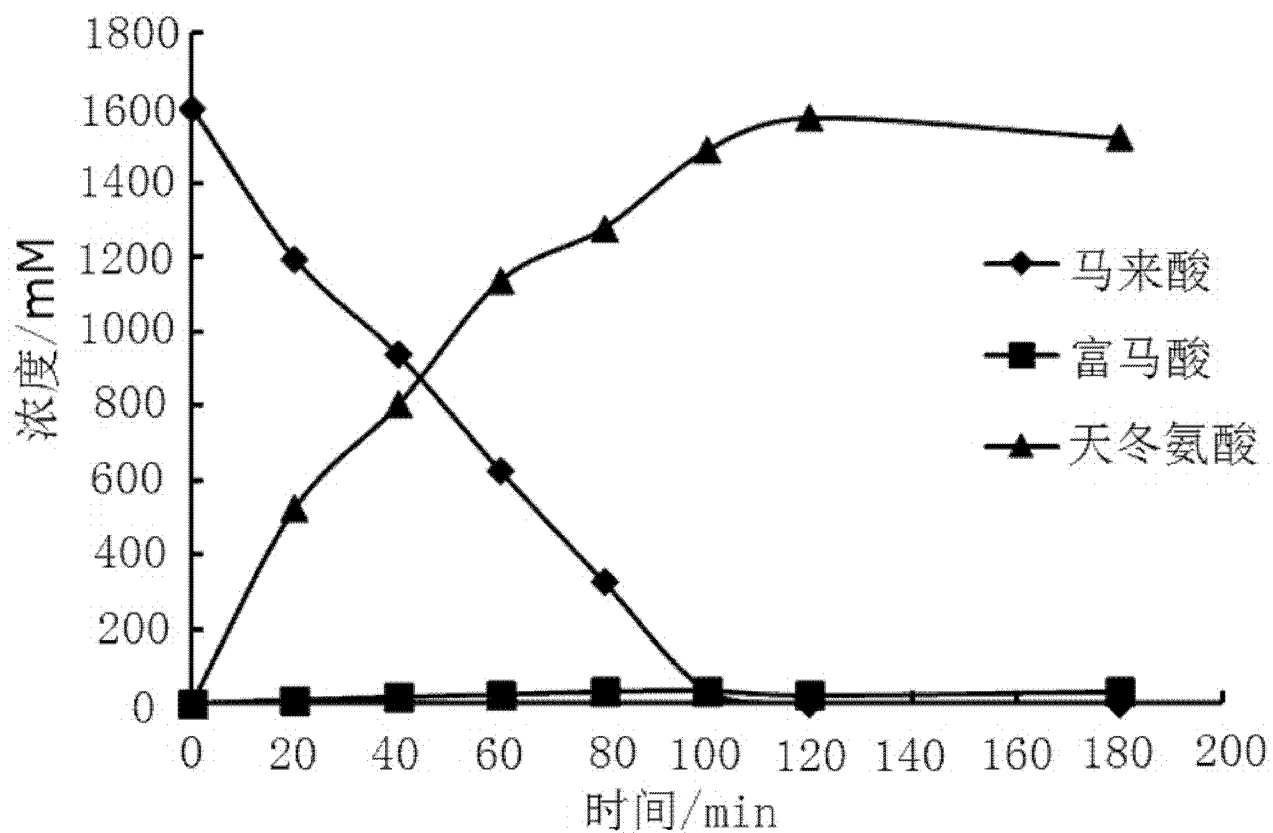


图 4

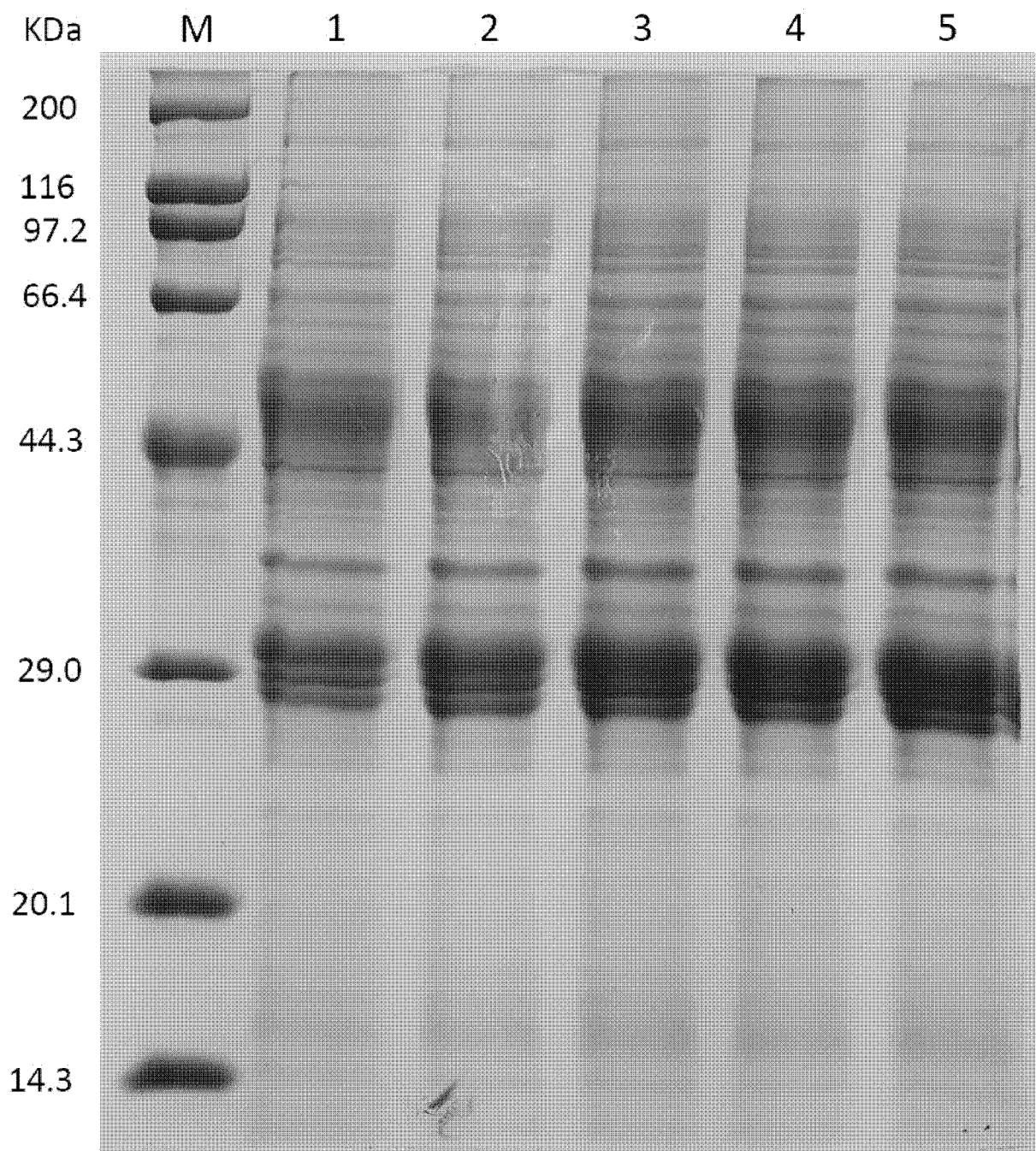


图 5

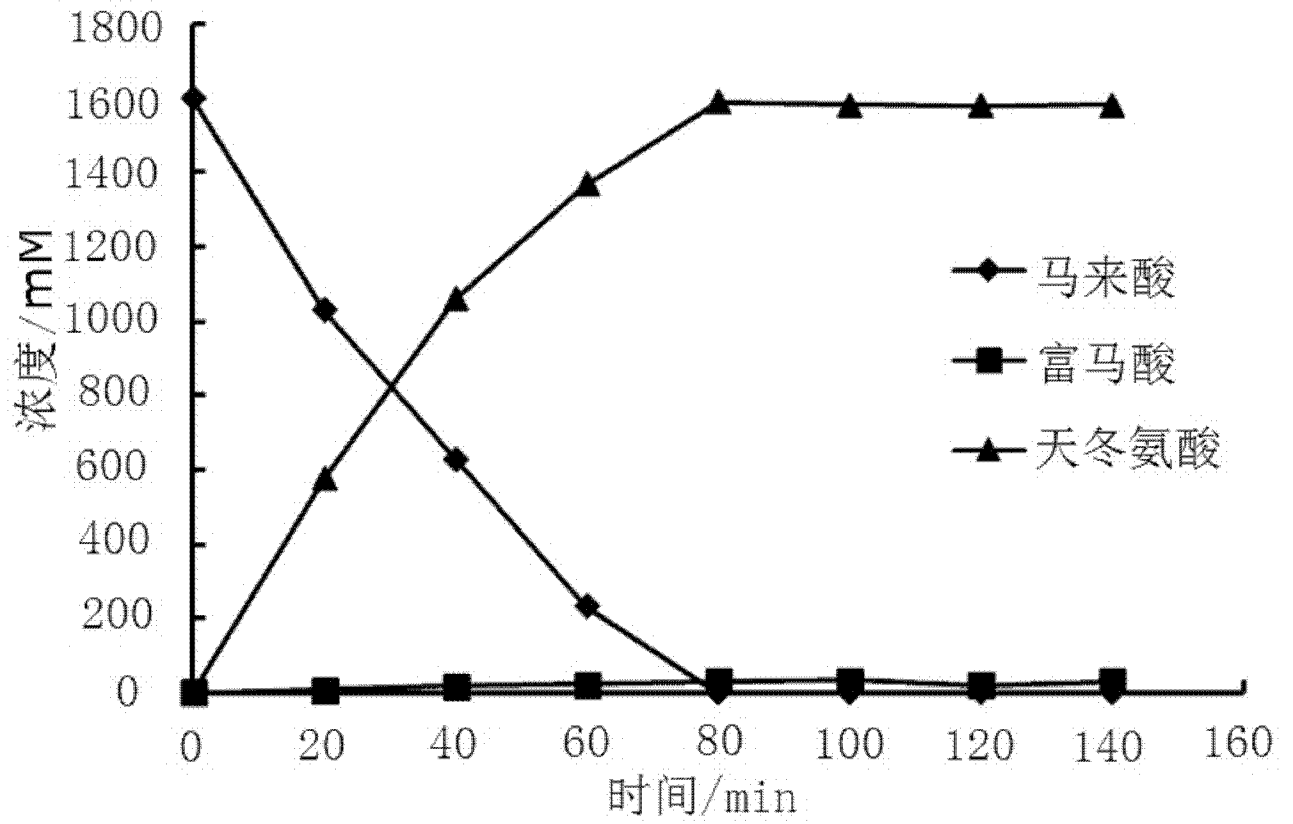


图 6

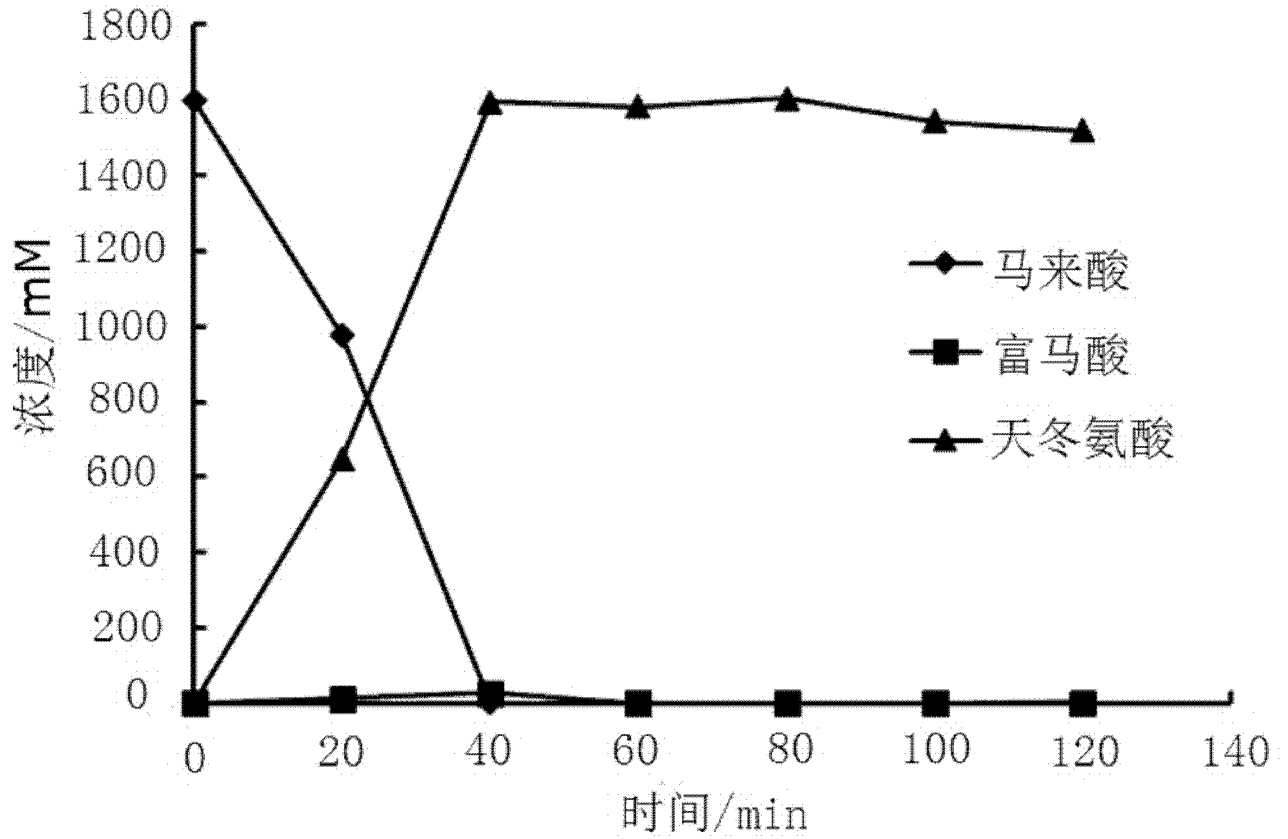


图 7

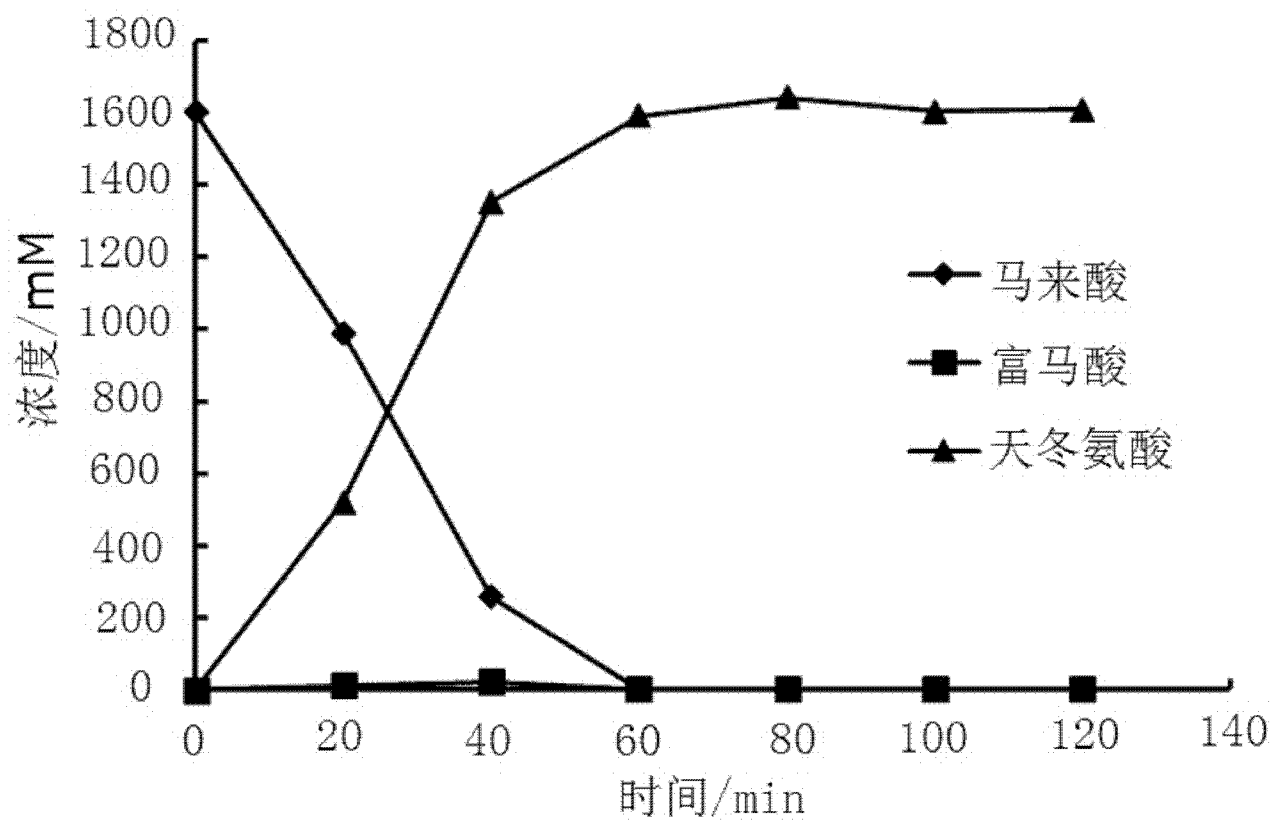


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/074337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 13/20(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P,C12N,C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, DWPI, CAPLUS, Genbank: 马来酸顺反异构酶, 天冬氨酸, 天冬氨酸裂解酶, 江南大学, 马来酸, 异构酶, 裂解酶, maleate cis-trans isomerase, aspartic acid, aspartic acid lyase, isomerase, lyase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 106636052 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 10 May 2017 (2017-05-10) see description, page 1, background art and content of the invention	1, 3
Y	JP 2000139466 A (MITSUBISHI CHEM. CORP.) 23 May 2000 (2000-05-23) see embodiments	1, 3
A	CN 106222122 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 14 December 2016 (2016-12-14) entire document	1-13
PX	CN 108103120 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 01 June 2018 (2018-06-01) claims	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2018

Date of mailing of the international search report

27 September 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/074337

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106636052	A	10 May 2017	None			
JP	2000139466	A	23 May 2000	None			
CN	106222122	A	14 December 2016	WO	2018014488	A1	25 January 2018
CN	108103120	A	01 June 2018	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/074337

A. 主题的分类 C12P 13/20(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12P, C12N, C12R 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI, CNABS, DWPI, CAPLUS, Genbank: 马来酸顺反异构酶, 天冬氨酸, 天冬氨酸裂解酶, 江南大学, 马来酸, 异构酶, 裂解酶, maleate cis-trans isomerase, aspartic acid, aspartic acid lyase, isomerase, lyase																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106636052 A (江南大学) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 参见说明书第1页背景技术和发明内容</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2000139466 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 2000年 5月 23日 (2000 - 05 - 23) 参见实施例</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106222122 A (江南大学) 2016年 12月 14日 (2016 - 12 - 14) 全文</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108103120 A (江南大学) 2018年 6月 1日 (2018 - 06 - 01) 权利要求书</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 106636052 A (江南大学) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 参见说明书第1页背景技术和发明内容	1, 3	Y	JP 2000139466 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 2000年 5月 23日 (2000 - 05 - 23) 参见实施例	1, 3	A	CN 106222122 A (江南大学) 2016年 12月 14日 (2016 - 12 - 14) 全文	1-13	PX	CN 108103120 A (江南大学) 2018年 6月 1日 (2018 - 06 - 01) 权利要求书	1-13
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 106636052 A (江南大学) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 参见说明书第1页背景技术和发明内容	1, 3															
Y	JP 2000139466 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 2000年 5月 23日 (2000 - 05 - 23) 参见实施例	1, 3															
A	CN 106222122 A (江南大学) 2016年 12月 14日 (2016 - 12 - 14) 全文	1-13															
PX	CN 108103120 A (江南大学) 2018年 6月 1日 (2018 - 06 - 01) 权利要求书	1-13															
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2018年 9月 13日		国际检索报告邮寄日期 2018年 9月 27日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 王少华 电话号码 62086353															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/074337

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	106636052	A	2017年 5月 10日	无	
JP	2000139466	A	2000年 5月 23日	无	
CN	106222122	A	2016年 12月 14日	WO 2018014488 A1	2018年 1月 25日
CN	108103120	A	2018年 6月 1日	无	