

文章编号: 1001-3555(2023)03-0285-08

## 解木糖赖氨酸芽孢杆菌发酵和生物催化产生 L-2-氨基己二酸

刘 姣, 夏仕文\*, 黄文薪

(重庆邮电大学 生物信息学院 大数据生物智能重庆市重点实验室, 重庆 400065)

**摘要:** 以解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 为出发菌株, 110 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐为发酵前体, 144 h 发酵后 L-2-氨基己二酸浓度达到 10.4 mmol/L, 产率为 9.5%。以解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 全细胞为生物催化剂, 利用共生的 L-赖氨酸 6-脱氢酶和 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶催化 L-赖氨酸单盐酸盐转化为 L-2-氨基己二酸。最优条件为: 细胞浓度为 45 g(干重)/L, L-赖氨酸单盐酸盐浓度为 100 mmol/L, pH=7.0, 温度为 30 °C, 反应时间 144 h。在最优条件下, 从 100 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐产生 90 mmol/L L-2-氨基己二酸, 产率为 90%。我们推测了生物催化过程中 L-2-氨基己二酸产生的反应机理。

**关键词:** 解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2; 发酵; 生物催化; L-2-氨基己二酸; L-赖氨酸 6-脱氢酶;  $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶

中图分类号: O643.3

文献标志码: A

DOI: 10.16084/j.issn1001-3555.2023.03.008

L-2-氨基己二酸(L-2-aminoadipic acid, L-2-AAA)是 $\beta$ -内酰胺抗生素青霉素 N 的前体, 也是化学合成新的抗生素和生理活性肽的手性中间体。L-2-氨基己二酸的生物制备方法主要包括: 1) 发酵法。Mochizuki 等<sup>[1]</sup>以 5% DL-哌啶-2-羧酸为发酵前体, *Alcaligenes* sp. 309B1 为发酵菌株, L-哌啶-2-羧酸完全同化, L-2-氨基己二酸累积量达到 2.8%。Fujii 等<sup>[2-3]</sup>从黄杆菌中得到了 L-赖氨酸 6-氨基转移酶和 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶基因并构建了一个重组菌, 用于以 L-赖氨酸为发酵前体发酵产生 L-2-氨基己二酸。发酵过程中需要添加 L-谷氨酸、氯化镁和氯化钙等无机盐。赵妍<sup>[4]</sup>对大肠杆菌进行代谢工程改造, 发酵产生的 L-2-氨基己二酸产量达到 18.3 mmol/L; 2) 不对称生物合成法。Matos 等<sup>[5]</sup>构建了一个谷氨酸脱氢酶/醇脱氢酶偶合体系和水-有机溶剂两相体系, 催化 $\alpha$ -酮己二酸还原胺化合成 L-2-氨基己二酸, 反应中需要的辅酶 NADH 以顺-1,2-环己基二甲醇为辅底物实现原位再生。该方法中使用的底物 $\alpha$ -酮己二酸成本较高; 3) 手性源生物合成法。Isobe 等<sup>[6-7]</sup>采用胺氧化酶和黑曲霉菌丝体催化 *N*<sup>ε</sup>-Z-L-赖氨酸合成 *N*<sup>ε</sup>-Z-L-2-氨基己二酸半醛和 *N*<sup>ε</sup>-Z-L-2-氨基己二酸, 但产率不高。该小组<sup>[8]</sup>进一步利用红球菌 AIU Z-35-1 细胞催化 *N*<sup>ε</sup>-Z-L-赖氨酸合成 *N*<sup>ε</sup>-

Z-L-2-氨基己二酸。经过 6 d 反应后, *N*<sup>ε</sup>-Z-L-2-氨基己二酸浓度达到 40 mmol/L, 产率为 80%。同一微生物细胞也用于催化 *N*<sup>ε</sup>-Z-L-赖氨酸合成 *N*<sup>ε</sup>-Z-L-2-氨基己二酸半醛, 产率为 95%。*N*<sup>ε</sup>-Z-L-2-氨基己二酸半醛可经化学氧化为 *N*<sup>ε</sup>-Z-L-2-氨基己二酸<sup>[9]</sup>。这些方法中尽管不需要辅酶, 但底物采用了 $\alpha$ -氨基保护的 L-赖氨酸。

L-赖氨酸 6-脱氢酶(L-LysDH)在 NAD<sup>+</sup>存在下催化 L-赖氨酸氧化脱氨为 L-2-氨基己二酸半醛(L-AASA), L-2-氨基己二酸半醛自动环合为 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸(P6C)<sup>[10]</sup>。 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶(P6CDH)催化 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢为 L-2-氨基己二酸<sup>[11]</sup>。利用 L-赖氨酸 6-脱氢酶/ $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶体系可将 L-赖氨酸转化为 L-2-氨基己二酸。

我们实验室从土壤中分离的一株解木糖赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus xylanilyticus*)XX-2, 含有多样性的 L-氨基酸脱氢酶, 已用于从 L-氨基酸制备 $\alpha$ -酮酸<sup>[12]</sup>和拆分 DL-氨基酸制备 D-氨基酸<sup>[13]</sup>。最近, 通过全基因组测序和基因注释发现该菌株中存在 L-赖氨酸 6-脱氢酶和 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶基因。我们首先以解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 为出发菌株, 以 L-赖氨酸单盐酸盐为前体, 采用发酵法产生 L-2-氨基己二酸。在解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2

收稿日期: 2022-12-31; 修回日期: 2023-02-20。

基金项目: 重庆市研究生科研创新项目(CYS22461)(Chongqing Postgraduate Research and Innovation Project(CYS22461))。

作者简介: 刘姣(1995-), 女, 硕士研究生, 合成生物学方向(Liu Jiao(1995-), Female, Master degree, Synthetic Biology)。

\* 通信联系人, E-mail: xiasw@cqupt.edu.cn。

发酵过程中,以L-赖氨酸单盐酸盐诱导产生胞内L-赖氨酸6-脱氢酶和 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶,利用全细胞催化L-赖氨酸单盐酸盐高效制备L-2-氨基己二酸。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

解木糖赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus xylanilyticus*)XX-2 系本实验室从土壤中筛选,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC No: M2015520。L-赖氨酸单盐酸盐 (>98%)、L-2-氨基己二酸 (>98%)、2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖 (GITC, >99%) 购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,其余试剂均为市售分析纯或化学纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 培养基

斜面培养基 (g/L): 牛肉膏 3, 酵母膏 5, 氯化钠 5, 琼脂 15, pH 6.5; 种子培养基 (g/L): 与斜面培养基相同, 无琼脂; 发酵培养基 (g/L): L-赖氨酸单盐酸盐 20, 其余成分与种子培养基相同; 产酶培养基 (g/L): L-赖氨酸单盐酸盐 (诱导剂)4, 其余成分与种子培养基相同。

#### 1.2.2 种子培养

取斜面培养基上保存的解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 菌种接种于 5 mL 种子培养基中, 30 °C、180 r/min 下恒温摇床振荡培养 48 h, 制得种子液。

#### 1.2.3 发酵产生 L-2-氨基己二酸

按 10% 接种量将种子液接种于 200 mL 发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 下恒温摇床振荡培养 192 h。每间隔 1 d 取发酵液, 采用分光光度法测定 OD<sub>600</sub>。柱前手性衍生-HPLC 测定 L-赖氨酸和 L-2-氨基己二酸浓度。

#### 1.2.4 细胞培养和收获

按 10% 接种量将种子液接种于 200 mL 产酶培养基中, 30 °C、180 r/min 下恒温摇床振荡培养 48 h。发酵液 4 °C、8 000 r/min 下离心 15 min, 菌体用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (KPB, pH=7.0) 洗涤两次, 重新悬浮在相同缓冲液中备用。

#### 1.2.5 生物催化反应条件优化

细胞浓度优化。20 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中含 0~80 g 干重细胞/L, 50 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐, 30 °C、180 r/min 下反应 48 h。

底物浓度优化。20 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲

液 (pH=7.0) 中含 45 g 干重细胞/L, 50~250 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐, 30 °C、180 r/min 下反应 48 h。

pH 优化。20 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH: 6.0~10.0) 中含 45 g 干重细胞/L, 50 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐, 30 °C、180 r/min 下反应 48 h。

温度优化。20 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.0) 中含 45 g 干重细胞/L, 50 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐, 20~40 °C、180 r/min 下反应 48 h。

#### 1.2.6 L-2-氨基己二酸制备和结构确认

200 mL 100 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.0) 中加入 3.6 g L-赖氨酸单盐酸盐, 9.0 g (干重) 湿细胞, 30 °C、180 r/min 下反应 192 h。反应液在 4 °C、8 000 r/min 下离心 15 min。上清液用微孔膜过滤去除蛋白质, 用盐酸调 pH 至 L-2-氨基己二酸等电点, 4 °C 下冷却过夜, 过滤, 冷水洗涤, 烘干。制备的 L-2-氨基己二酸溶解在 6 mol/L 盐酸中形成盐酸盐。通过采用 NMR 测定 L-2-氨基己二酸盐酸盐的结构确认产生的 L-2-氨基己二酸结构。

#### 1.2.7 L-赖氨酸转化中间产物鉴定

L-赖氨酸转化中间产物 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸采用化学法鉴定<sup>[14]</sup>。

2,4-二硝基苯肼显色法。反应液离心后的 1 mL 上清液与 1 mL 1 mol/L 2,4-二硝基苯肼混合, 37 °C 下水浴加热 20 min, 冷却至室温。加入 5 mL 1.5 mol/L NaOH 溶液混匀, 5 °C 下静置 2 d, 观察颜色变化。

TLC 法。反应液离心后的上清液在硅胶板上用正丁醇-醋酸-水 (3 : 1 : 1, v : v) 展开, 茚三酮溶液显色, L-赖氨酸单盐酸盐、L-2-氨基己二酸溶液作对照。

#### 1.2.8 分析方法

发酵液和细胞悬浮液中的生物质浓度采用分光光度法在 600 nm 下测量。1 个 OD<sub>600</sub> 相当于 0.373 mg 干重细胞 (DWC)/mL。

发酵和生物催化过程中 L-赖氨酸、L-2-氨基己二酸浓度采用柱前手性衍生-HPLC 分离和测定。取 1 mL 发酵液或转化液, 12 000 r/min 离心 1 min 弃去细胞。取 100  $\mu$ L 上清液, 加入 150  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 250  $\mu$ L 三乙胺乙腈溶液 (39.5 mmol/L) 和 500  $\mu$ L 2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖异硫氰酸酯 (GITC) 乙腈溶液 (16.9 mmol/L), 30 °C 下衍生 30 min, 离心。上清液采用 HPLC 法在 Alltech 高效液相色谱仪上测定。色谱柱: Sepax MAH-C18(250 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m),

流动相: 0.1% 三氟乙酸/甲醇 (40 : 60, v : v), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 254 nm, 柱温: 25 °C. L-赖氨酸的 GITC 衍生物和 L-氨基己二酸的 GITC 衍生物的保留时间分别为 7.9、24.8 min.

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵产生 L-2-氨基己二酸

熊文娟<sup>[13]</sup>对解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 的培养基成分和培养条件进行了优化. 最优的培养基组成 (g/L): 牛肉膏 3, 酵母膏 5, 氯化钠 5. 最优培养条件为: pH=6.5, 30 °C, 48 h. 我们在此培养条件下, 以牛肉膏为碳源, 酵母膏为氮源, 110 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐为前体, 开展了解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 发酵产生 L-2-氨基己二酸的研究 (图 1).

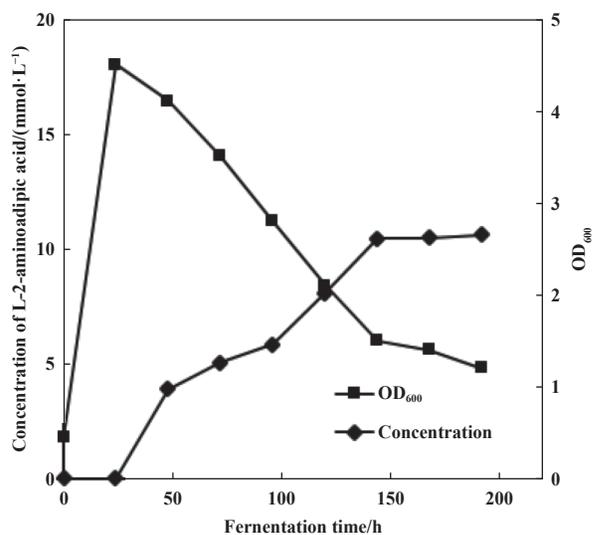


图1 发酵过程中细胞生长和 L-2-氨基己二酸产生的时间进程

Fig.1 Time course of cell growth and production of L-2-aminoadipic acid in fermentation

Fermentation broth (200 mL) contained 3 g/L beef extract, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 20 g/L L-lysine monohydrochloride. pH 6.5, 30 °C, 180 r/min

结果表明, 发酵时间为 24 h 时, L-赖氨酸单盐酸盐消耗完全, 细胞生物量达到最大, 在发酵液中未观察到 L-2-氨基己二酸产生, 但观察到发酵液中有中间产物累积. 此后随着发酵时间延长, 细胞生物量减小, 144 h 时 OD<sub>600</sub> 为 1.5. 细胞停止生长后, L-2-氨基己二酸的产量随保温时间延长逐渐增大, 144 h 时达到最大, 累积浓度达到 10.4 mmol/L, 产率 9.5%. 此后随着发酵时间的延长, 细胞继续裂解, 但 L-2-

氨基己二酸产量不再增加. 一个合理的解释是发酵过程中, 发酵前体 L-赖氨酸单盐酸盐转化为中间体  $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸并诱导产生  $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶. 发酵完成后,  $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸在  $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶催化下转化为 L-2-氨基己二酸.

### 2.2 生物催化产生 L-2-氨基己二酸

#### 2.2.1 生物催化条件优化

采用单因素法, 研究了以解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 细胞为生物催化剂, L-赖氨酸单盐酸盐为底物, 细胞浓度、底物浓度、pH 和温度等生物催化条件对 L-2-氨基己二酸产生的影响.

考察了细胞浓度和 L-赖氨酸单盐酸盐浓度对 L-2-氨基己二酸产生的影响. L-2-氨基己二酸产率随细胞浓度的增加而增大, 当细胞浓度为 45 g(干重)/L 时达到最大. 此后, 因为质量扩散阻力, L-2-氨基己二酸产率随细胞浓度增大而减小 (图 2(a)). 因此, 最优的细胞浓度为 45 g(干重)/L. L-2-氨基己二酸产率随 L-赖氨酸单盐酸盐浓度的增加而增大, 当 L-赖氨酸单盐酸盐浓度为 100 mmol/L 时达到最大. 此后, 因为底物对酶的抑制作用, L-2-氨基己二酸产率随底物浓度增大而急剧减小 (图 2(b)). 因此, L-赖氨酸单盐酸盐的最优浓度为 100 mmol/L.

考察了 pH 值大小以及温度对 L-2-氨基己二酸产生的影响. L-2-氨基己二酸产率随 pH 值增大而增大, 当 pH 值为 7.0 时达到最大, 此后随 pH 值增大而减小 (图 3(a)). 因此, 最适 pH 值为 7.0. L-2-氨基己二酸产率随温度升高而增大, 30 °C 时达到最大, 此后随着温度的升高导致酶失活而减小 (图 3(b)). 因此, 最适温度为 30 °C.

#### 2.2.2 L-2-氨基己二酸产生的时间进程

在放大反应中, 考察了反应时间对 L-2-氨基己二酸产生的影响 (图 4). 在最优生物催化条件下 (细胞浓度 45 g(干重)/L, L-赖氨酸单盐酸盐浓度 100 mmol/L, pH=7.0, 温度为 30 °C), 100 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐在 pH=7.0、30 °C 下反应 192 h, 反应达到平衡转化点, L-2-氨基己二酸浓度达到 90 mmol/L, 产率为 90%. 随着反应时间的进一步增加, L-2-氨基己二酸浓度不再增加.

#### 2.2.3 L-2-氨基己二酸制备和结构确认

以解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 细胞为生物催化剂, L-赖氨酸单盐酸盐为底物, 制备的 L-2-氨基己二酸, 采用柱前手性衍生-HPLC 分离. L-氨基己二酸的 GITC 衍生物的保留时间与对照品的 GITC 衍

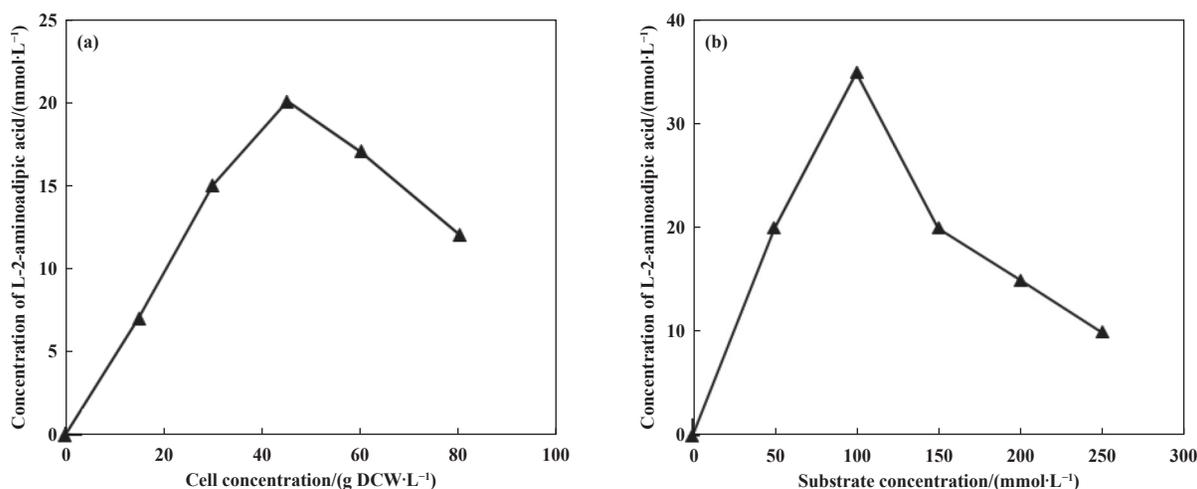


图 2 细胞浓度 (a) 和底物浓度 (b) 对 L-2-氨基己二酸产生的影响

Fig.2 Effect of cell concentration (a) and substrate concentration (b) on production of L-2-aminoadipic acid  
Reaction mixture(20 mL) contained 100 mmol/L phosphate buffer(pH=7.0), L-lysine monohydrochloride and cells.  
30 °C, 180 r/min, 48 h  
(a): 50 mmol/L L-lysine monohydrochloride, 0~80 g DWC/L; (b): 45 g DWC/L,  
50~250 mmol/L L-lysine monohydrochloride

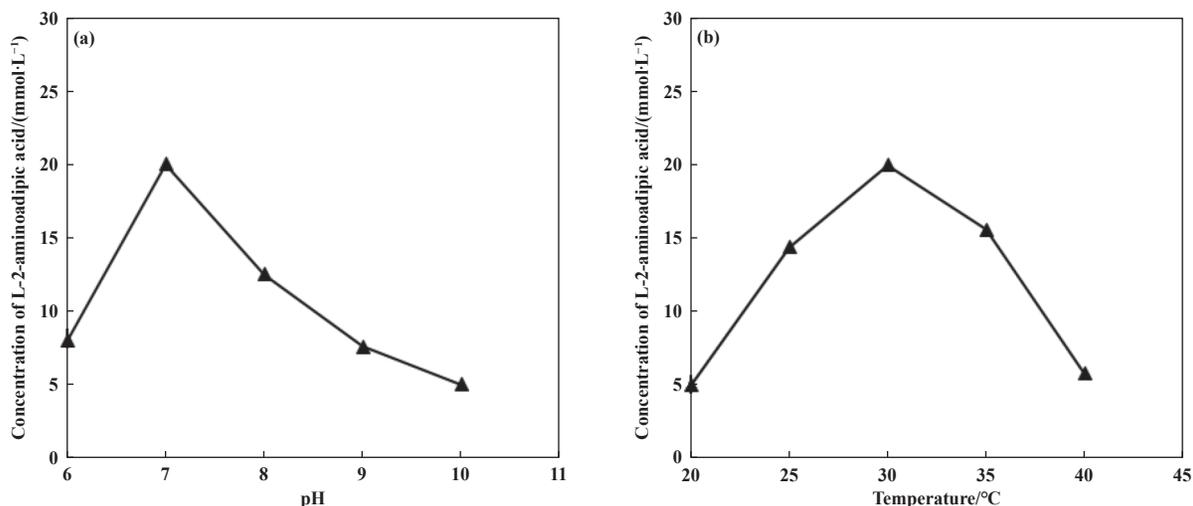


图 3 pH (a) 和温度 (b) 对 L-2-氨基己二酸产生的影响

Fig.3 Effect of pH (a) and temperature (b) on production of L-2-aminoadipic acid

Reaction mixture(20 mL) contained 100 mmol/L phosphate buffer, 50 mmol/L L-lysine monohydrochloride and  
45 g DCW/L. 180 r/min, 48 h  
(a): pH: 6~10, 30 °C; (b): 20~40 °C, pH=7.0

生物一致 (图 5)。

L-2-氨基己二酸的水溶性很小, 其盐酸盐的水溶性较好. 通过对产物盐酸盐的<sup>1</sup>HNMR 测定, 进一步证实了制备的产物为 L-2-氨基己二酸. 产物盐酸盐的<sup>1</sup>HNMR 图谱见图 6. <sup>1</sup>HNMR(400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ7.99(s, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 4.79(m, 1H, H-2), 3.83(t, 2H, H-5),

2.17(q, 2H, H-3); 1.71(m, 2H, H-4).

### 2.3 生物催化反应机理推测

L-赖氨酸单盐酸盐转化中间产物Δ-1-哌啶啉-6-羧酸与 L-2-氨基己二酸半醛处于平衡中, 很难分离和纯化, 且无商用对照品. 为此, 我们按照文献提供的方法, 采用 2,4-二硝基苯肼 (DNP) 法和 TLC 法,

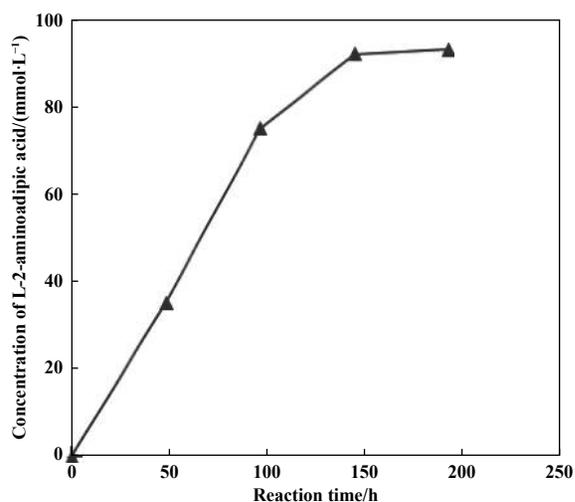


图 4 L-2-氨基己二酸产生的时间进程

Fig.4 Time course of L-2-aminoadipic acid production

Reaction mixture(200 mL) contained 100 mmol/L phosphate buffer(pH=7.0), 100 mmol/L L-lysine monohydrochloride and 45 g DCW/L, 30 °C, 180 r/min

对解木糖赖氨酸芽孢杆菌 XX-2 细胞催化 L-赖氨酸单盐酸盐 24 h 反应后反应液中的中间产物进行了

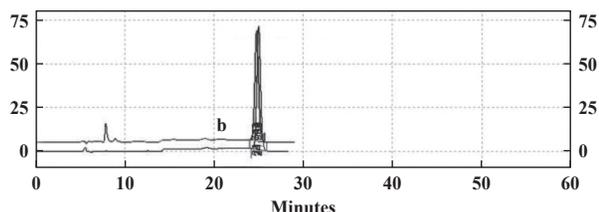


图 5 转化产物 (a) 和 L-2-氨基己二酸 (b) 的 GITC 衍生物 HPLC 图谱

Fig.5 HPLC profile of GITC-derivatives of both product (a) and authentic L-2-aminoadipic acid (b)

鉴定. 采用 2,4-二硝基苯肼法检测时, 反应液未立即显色, 在 5 °C 下长时间放置后, 呈现红棕色, 证实反应液中有含醛基的组分存在, 但含量较低. 进一步采用 TLC 检测, 茚三酮显色, 加热, 在 L-赖氨酸单盐酸盐和 L-2-氨基己二酸之间呈现黄色斑点. Δ-1-哌啶啉-6-羧酸用茚三酮显色, 加热脱羧形成的产物显示黄色斑点, 与其它氨基酸用茚三酮显色得到紫红色斑点不同. 因此, 比移值介于 L-赖氨酸单盐酸盐和 L-2-氨基己二酸之间的黄色斑点即为推断的中

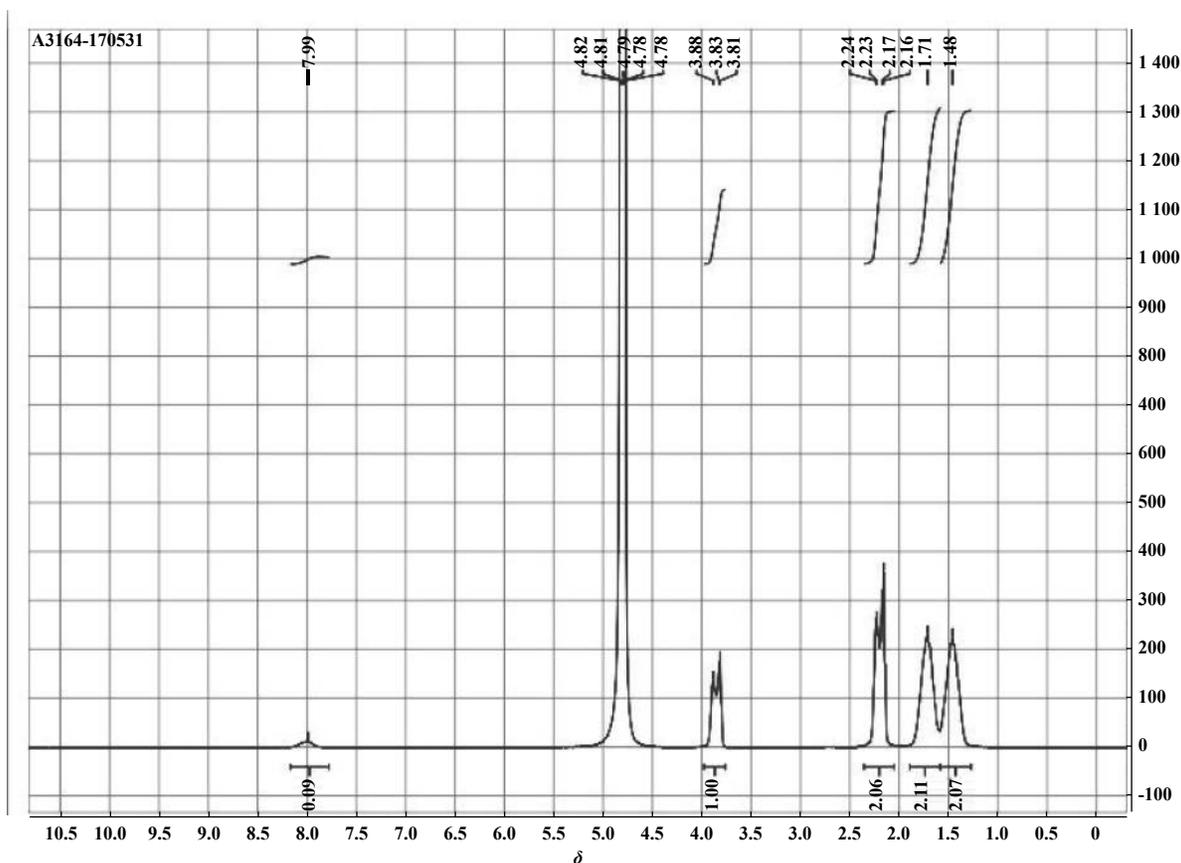


图 6 源于 L-赖氨酸单盐酸盐转化的 L-2-氨基己二酸盐的<sup>1</sup>H NMR

Fig.6 <sup>1</sup>H NMR of L-2-aminoadipic acid hydrochloride from conversion of L-lysine monohydrochloride

中间体 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸(图7)<sup>[14]</sup>.

微生物中, $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸( $\Delta$ -1-piperideine-6-carboxylate, P6C)途径是L-赖氨酸的代谢途径之一<sup>[15]</sup>.L-赖氨酸在L-赖氨酸6-氨基转移酶(L-lysine 6-aminotransferase, LAT)或L-赖氨酸6-脱氢酶(L-lysine 6-dehydrogenase, LysDH)作用下转化为 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸,然后在 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶( $\Delta$ -1-piperideine-6-carboxylate dehydrogenase, P6CDH)作用下转化为L-2-氨基己二酸.

L-赖氨酸6-氨基转移酶催化L-赖氨酸代谢需要氨基受体如 $\alpha$ -酮戊二酸参与.在解木糖赖氨酸芽孢杆菌XX-2细胞催化L-赖氨酸的生物催化过程中,缺乏氨基转移条件.因此,反应是通过L-赖氨酸6-脱氢酶催化进行的.我们的全基因组测序结果也表明,解木糖赖氨酸芽孢杆菌XX-2中存在L-赖氨酸6-脱氢酶和 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶基因.结合发酵过程中L-2-氨基己二酸的产生过程和L-赖氨酸代谢中间体鉴定,推断该菌株在生长过程中,L-赖氨酸诱导产生L-赖氨酸6-脱氢酶和 $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸脱氢酶.因此,解木糖赖氨酸芽孢杆菌XX-2全细

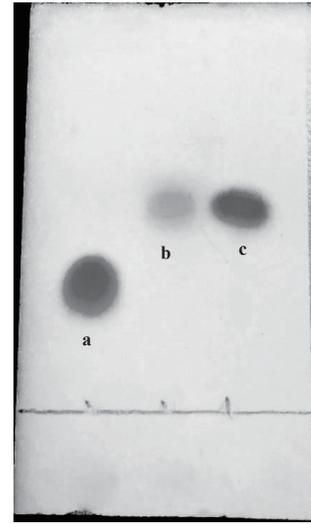


图7 L-赖氨酸单盐酸盐(a)、24 h 反应后的中间产物(b)和L-2-氨基己二酸(c)的薄层色谱

Fig.7 TLC of L-lysine monohydrochloride(a), intermediate product after 24 h reaction(b) and L-2-aminoadipic acid(c)

胞催化L-赖氨酸产生L-2-氨基己二酸的反应机理推测如图示1.

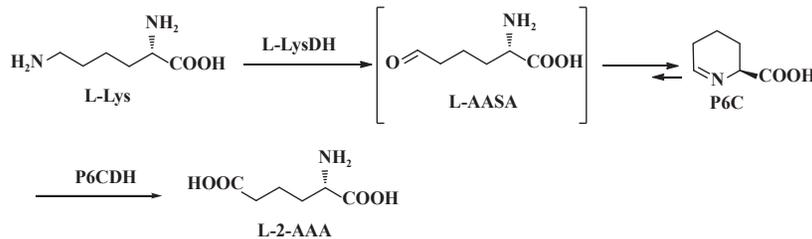


图1 解木糖赖氨酸芽孢杆菌XX-2催化L-赖氨酸产生L-2-氨基己二酸的反应机理推测

Scheme1 Postulated mechanism for the production of L-2-aminoadipic acid from L-Lysine by *Lysinibacillus xylanilyticus* XX-2

### 3 结论

以110 mmol/L L-赖氨酸单盐酸盐为发酵前体,解木糖赖氨酸芽孢杆菌XX-2发酵144 h后,L-2-氨基己二酸浓度达到10.4 mmol/L,产率为9.5%.解木糖赖氨酸芽孢杆菌XX-2全细胞催化L-赖氨酸单盐酸盐转化为L-2-氨基己二酸的最优条件为:细胞浓度为45 g(干重)/L,L-赖氨酸单盐酸盐浓度为100 mmol/L,pH=7.0,温度为30℃,反应时间为144 h.L-2-氨基己二酸浓度达到90 mmol/L,产率为90%.生物催化法中的底物L-赖氨酸无需对其 $\alpha$ -氨基进行保护,直接利用解木糖赖氨酸芽孢杆菌XX-2诱导产生的共生L-赖氨酸6-脱氢酶/ $\Delta$ -1-哌啶啉-6-羧酸

脱氢酶体系,以级联的方式转化为L-2-氨基己二酸.相对于发酵法,生物催化法具有收率高、分离方法简单的优点,为L-2-氨基己二酸的制备提供了一种新的生物途径.

### 参考文献:

- [1] Mochizuki K, Yamazaki Y, Maeda H. Simultaneous production of D-pipecolic acid and L- $\alpha$ -aminoadipic acid from DL-pipecolic acid using a microorganism[J]. *Agric Biol Chem*, 1988, **52**(5): 1113-1116.
- [2] Fujii T, Narita T, Agematu H, et al. Characterization of L-lysine 6-aminotransferase and its structural gene from *Flavobacterium lutescens* IFO3084[J]. *J*

- Biochem*, 2000, **128**(3): 391–397.
- [ 3 ] Fujii T, Narita T, Agematu H, *et al.* Cloning and characterization of *pcd* encoding  $\Delta^1$ -piperidine-6-carboxylate dehydrogenase from *Flavobacterium lutescens* IFO3084[J]. *J Biochem*, 2000, **128**(3): 975–982.
- [ 4 ] Zhao Yan(赵 妍). Metabolic engineering transforms to produce  $\alpha$ -aminoadipate(代谢工程改造大肠杆菌生产  $\alpha$ -氨基己二酸)[D]. Beijing(北京): Beijing University of Chemical Technology(北京化工大学), 2020.
- [ 5 ] Matos J R, Wong C H. Biphasic one-pot synthesis of two useful and separable compounds using cofactor-requiring enzymatic reactions: Glutamate dehydrogenase catalyzed synthesis of L- $\alpha$ -aminoadipate coupled with alcohol dehydrogenase catalyzed synthesis of a chiral lactone[J]. *J Org Chem*, 1986, **51**(12): 2388–2389.
- [ 6 ] Isobe K, Tokuta K, Narita Y, *et al.* Formation of N  $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-aminoadipic acid from N  $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-lysine with mycelia from *Aspergillus niger*[J]. *J Mol Cat B:Enzymatic*, 2004, **30**(1): 13–18.
- [ 7 ] Isobe K, Tokuta K, Narita Y, *et al.* A method for production of N  $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-aminoadipate- $\alpha$ -semialdehyde with amine oxidase from *Aspergillus niger*[J]. *J Mol Cat B:Enzymatic*, 2004, **30**(3/4): 119–123.
- [ 8 ] Isobe K, Tokuta K, Narita Y, *et al.* Production of N  $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-aminoadipic acid and N  $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-D-aminoadipic acid with *Rhodococcus sp.* AIU Z-35-1[J]. *J Mol Cat B:Enzymatic*, 2004, **32**(1/2): 27–32.
- [ 9 ] Isobe K, Nagasawa S, Tokuta K, *et al.* A new microbial method for more efficient production of N  $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-aminoadipate- $\alpha$ -semialdehyde and N  $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-D-aminoadipate- $\alpha$ -semialdehyde[J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, **100**(3): 288–291.
- [ 10 ] Yoneda K, Fukuda J, Sakuraba H, *et al.* First crystal structure of L-lysine 6-dehydrogenase as an NAD-dependent amine dehydrogenase[J]. *J Bio Chem*, 2010, **285**(11): 8444–8453.
- [ 11 ] Hasse D, Hülsemann J, Carlsson G H, *et al.* Structure and mechanism of piperidine-6-carboxylate dehydrogenase from *Streptomyces clavuligerus*[J]. *Acta Cryst Sec D Str Bio*, 2019, **75**(12): 1107–1118.
- [ 12 ] Xia Shi-wen(夏仕文), Xiong Wen-juan(熊文娟), Wei Yan-chan(韦燕婵), *et al.* A preparative method of  $\alpha$ -keto acid by *Lysinibacillus xylanilyticus* (一种解木糖赖氨酸芽孢杆菌及其制备  $\alpha$ -酮酸的方法) [P]. CN(中国专利), ZL201510697875.6, 2016-02-10.
- [ 13 ] Xiong Wen-juan(熊文娟). Synthesis of D-amino acids by microbial L-AAO(微生物L-AAO催化合成D-氨基酸)[D]. Chongqing(重庆): Chongqing University of Posts and Telecommunications(重庆邮电大学), 2016.
- [ 14 ] Rodwell, Victor W. Metabolism of amino acids and amines part B:  $\Delta^1$ -Piperidine-6-carboxylic acid and  $\alpha$ -aminoadipic acid  $\delta$ -semialdehyde[J]. *Method Enzymol*, 1971, **17**: 188–199.
- [ 15 ] He M. Pipecolic acid in microbes: Biosynthetic routes and enzymes[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, **33**(6): 401–407.

## Fermentative and Biocatalytic Production of L-2-Aminoadipic Acid by *Lysinibacillus xylanilyticus* XX-2

LIU Jiao, XIA Shi-wen<sup>\*</sup>, HUANG Wen-xin

(Chongqing Key Laboratory of Big Data for Bio-intelligence, College of bioinformatics, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China)

**Abstract:** The concentration of L-2-aminoadipic acid reached 10.4 mmol/L with 9.5% yield after 144 h fermentation with *Lysinibacillus xylanilyticus* XX-2 as the starting strain and 110 mmol/L L-lysine monohydrochloride as the precursor. Using the whole cells of *Lysinibacillus xylanilyticus* XX-2 as the biocatalyst, the symbiotic L-lysine 6-dehydrogenase and  $\Delta$ -1-piperidine-6-carboxylate dehydrogenase cascade catalyzed the conversion of L-lysine monohydrochloride into L-2-aminoadipic acid. The optimal conditions were as follows: cell concentration 45 g DWC/L, concentration of L-lysine monohydrochloride 100 mmol/L, pH=7.0, temperature 30 °C, reaction time 144 h. Under the optimal conditions, 90 mmol/L L-2-aminoadipic acid was produced from 100 mmol/L L-lysine monohydrochloride with 90% yield. The reaction mechanism of L-2-aminoadipic acid production was postulated.

**Key words:** *Lysinibacillus xylanilyticus* XX-2; fermentation; biocatalysis; L-2-aminoadipic acid; L-lysine 6-dehydrogenase;  $\Delta$ -1-piperidine-6-carboxylate dehydrogenase