

一种利用甘氨酸氧化酶生产乙醛酸的方法

王玉成¹, 宋伟¹, 艾连中², 吴静¹

(1. 江南大学药学院, 江苏无锡 214122; 2. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 为实现生物法工业化生产乙醛酸, 采用基因工程技术对甘氨酸氧化酶 (ThiO) 进行表达优化, 使用 SDS-PAGE 电泳手段验证 ThiO 的可溶性表达, 通过全细胞转化法检测重组菌体生产乙醛酸的能力, 并优化了反应条件, 在放大体系中考察其应用性。结果表明: 构建的菌株 *Bacillus subtilis* 168 (pP43NMK-ThiO) 实现了 ThiO 的可溶性表达, 全细胞转化甘氨酸生产乙醛酸的产量超越了当前生物法制备的最高产量。全细胞催化剂的最佳反应条件为温度 30 °C 和 pH 值 8.3, 在 35 °C 内保持高热稳定性, 保温 8 h 后仍保持 90% 以上反应活性。在最佳反应条件下添加终浓度 1% 的过氧化氢酶使得乙醛酸产量提升, 相对产率提高了 30%。3 L 发酵罐上的结果与摇瓶上一致, 显示出全细胞法制备乙醛酸的稳定的转化能力, 为其工业化奠定了基础。

关键词: 甘氨酸; 甘氨酸氧化酶; 可溶性表达; 全细胞催化; 乙醛酸

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A

Production of glyoxylic acid by glycine oxidase

WANG Yucheng¹, SONG Wei¹, AI Lianzhong², WU Jing¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In order to realize the industrial production of glyoxylic acid, the expression of glycine oxidase (ThiO) was optimized using genetic engineering technology. The soluble expression of recombinant strains was verified by SDS-PAGE electrophoresis. The ability of recombinant bacteria to produce glyoxylic acid was tested by whole cell transformation. With the optimization of reaction conditions, its applicability in the enlarged transformation system was investigated. The strain *Bacillus subtilis* 168 (pP43NMK-ThiO) achieved intracellular soluble expression and the yield of glyoxylic acid from glycine by the whole cell transformation surpassed the highest yield of glyoxylic acid produced by current biological methods. The best reaction conditions were 30 °C and pH value 8.3. The whole cell catalyst maintained high thermal stability at 35 °C, and more than still maintains more than reaction activity after 8 h incubation. Under the optimal reaction conditions, the yield was further increased to 30% by adding catalase at a final concentration of 1%. The results from the 3 L fermentation tank are consistent with those obtained from the shake flask, showing stable conversion capacity. The results lays

收稿日期: 2020-02-21

基金项目: 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (LITE2018-20)

第一作者: 王玉成 (1996-), 男, 硕士研究生。研究方向: 药物中间体生物合成。E-mail: wycbest9@126.com

通信作者: 吴静 (1981-), 女, 教授。研究方向: 药物及药物中间体生物合成。E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

the foundation for the industrialization of the preparation of glyoxylic acid by the biological method.

Keywords: glycine; glycine oxidase; soluble expression; whole cell catalysis; glyoxylic acid

乙醛酸 (glyoxylic acid) 是一种重要的化工原料, 广泛应用于生产口服青霉素^[1]、香兰素^[2]、乙基香兰素和尿囊素等重要化学品。同时, 乙醛酸能与苯酚缩合生成 4-羟基扁桃酸, 与氨反应生成羟基苯甘氨酸, 是药物阿莫西林的重要前体^[3]。

乙醛酸工业生产方法主要包括草酸电解法(草酸水溶液经电解还原, 生成乙醛酸稀溶液)和乙二醛氧化法(乙二醛经贵金属催化生成乙醛酸)^[4]。但是上述生产方法面临工艺复杂、能耗高、产品纯化困难等问题。另一方面, 化学生产会造成环境污染。

生物技术法具有绿色节能、可持续性 & 副产物少等特点^[5], 如乙醇酸经乙醇酸氧化酶生成乙醛酸, 也有以木糖为底物采用微生物发酵生产乙醛酸^[6]。然而, 生物法生产乙醛酸面临产量低、反应时间长等缺点, 限制了其工业化应用, 如图 1 所示, 在 KEGG 数据库中甘氨酸能经甘氨酸氧化酶 (glycine oxidase, ThiO, EC 1.4.3.19) 的催化, 生产乙醛酸^[7]。这一反应表明, 若能以廉价易得的甘氨酸作为底物, 生物催化生产乙醛酸, 不仅能有效地缩减乙醛酸工业化固定资产, 还能有效地消耗甘氨酸过剩的产能, 带来良好的经济效益和产业价值。但是, 目前尚无利用 ThiO 催化生产乙醛酸的研究报道^[8-9], 其产业瓶颈在于 ThiO 的表达是以包涵体的形式存在^[10]。

针对上述问题, 本研究以实现 ThiO 的可溶性表达^[11-12]为目标, 使用不同表达宿主和表达载

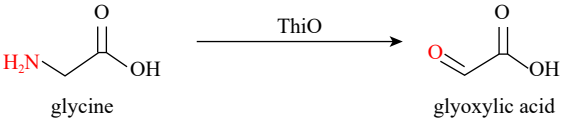


图 1 甘氨酸氧化酶催化甘氨酸生成乙醛酸
Fig. 1 Glycine oxidase catalyzes glycine to glyoxylic acid

体^[13-15], 构建表达 ThiO 的重组菌株。检测了重组菌体作为生物全细胞催化剂制备乙醛酸的潜力。并探究全细胞催化剂的最优反应条件及外源物添加对转化反应的影响, 通过放大转化体系考察其应用性。为全细胞法催化甘氨酸生产乙醛酸的工业化提供理论依据和应用基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与引物

ThiO 基因来源菌株为 *Bacillus subtilis* 168, GenBank 中基因信息 (NCBI 基因 ID: 939377; NCBI 蛋白 ID: NP_389049)。克隆宿主 *E.coli* JM109、表达宿主 *E.coli* BL21 (DE3) 和 *Bacillus subtilis* 168 购买自中国普通微生物菌种保藏中心 CGMCC 和中国农业微生物菌种保藏中心 ACCC。*E.coli* 表达载体 pET-28a(+)(T7 启动子, Kana^r)、pGEX-6P-1 (含有 N-GST 标签, Tac 启动子, Amp^r)、pCOLDI (CSPA 冷启动子, Amp^r) 和 *Bacillus subtilis* 168 表达载体 pP43NMK (P43 启动子, Kana^r) 为本实验室保藏。同源引物合成及基因序列测序工作均委托苏州金唯智生物工程有限公司。本研究使用引物见表 1。

表 1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in this study

名称	引物序列(5'→3')
pET-28a(+)-F	CCGAATTCGAGCTCCGTCGACATGAAAAGGCATTATGAAGCAGTG
pET-28a(+)-R	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTCATATCTGAACCGCCTCCTTG
pGEX-6P-1-F	CCTGGGATCCCCGGAATTCATGAAAAGGCATTATGAAGC
pGEX-6P-1-R	GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTCATATCTGAACCGCCTCCTTG
pCOLDI-F	TGAGCTCGGTACCCCTCGAGATGAAAAGGCATTATGAAGC
pCOLDI-R	CTATCTAGACTGCAGGTGCGACTCATATCTGAACCGCCTCCTTG
pP43NMK-F	AAGTGATAGCGGTACCAAGAGGAGGAATTAATGAAAAGGCATTATGAAG
pP43NMK-R	CGTAGGTGGTGTGGCCGGGTCATATCTGAACCGCCTCCTTG

1.2 试剂与培养基

Ex Taq DNA 聚合酶、限制内切酶、连接酶和过氧化氢酶购自 Takara(大连)有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司; 甘氨酸、乙醛酸、通透剂 CTAB、曲拉通(X-100)和吐温-80 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

LB(Luria-Bertani)培养基成分: 酵母粉 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L。固体培养基另加 2% 的琼脂粉。TB 培养基成分: 酵母粉 24 g/L, 胰蛋白胨 12 g/L, 甘油 4 g/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L。

1.3 重组质粒的构建

按照细菌基因组提取试剂盒的操作步骤从 *Bacillus subtilis* 168 菌体中提取基因组。以基因组为模板, 使用设计的不同载体对应的同源引物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增和胶回收。按照质粒提取试剂盒提取质粒。pET-28a(+) 质粒选择 *Sal* I 和 *Xho* I 位点酶切; pGEX-6P-1 质粒选择 *Eco*R I 和 *Xho* I 位点酶切; pCOLDI 质粒选择 *Xho* I 和 *Eco*R I 位点酶切; pP43NMK 质粒选择 *Kpn* I 和 *Sma* I 位点酶切。酶切过后的质粒片段与扩增片段使用连接酶进行连接, 连接产物导入 *E.coli* JM109 感受态细胞后涂布平板。通过抗性筛选、挑取阳性克隆子菌落 PCR 验证及基因序列测序完成验证。

1.4 发酵产酶

以 *E.coli* BL21(DE3) 为表达宿主、pET-28a(+) 为表达载体的重组菌发酵产酶过程为: 先在 LB 固体平板上划线, 37 °C 过夜培养; 然后挑取平板上单菌落接种于含有卡那抗性的 LB 液体培养基(终浓度为 0.4 mmol/L)中, 在 37 °C、200 rpm 恒温摇床上震荡培养 12 h; 再将上述种子菌液按照 2% 接种量接种于卡那抗性的 TB 培养基中, 在 37 °C、200 rpm 恒温摇床上震荡培养 2 h 左右, 待菌液 OD_{600} 达到 0.6, 再添加诱导剂 IPTG 置于 25 °C、200 rpm 恒温摇床上诱导 12 h。

以 *E.coli* BL21(DE3) 为表达宿主、pGEX-6P-1 为表达载体的重组菌发酵产酶操作与 pET-28a(+) 为表达载体的重组菌基本相同, 但使用的选择抗性为 Amp 抗性。

以 *E.coli* BL21(DE3) 为表达宿主、pCOLDI 为表达载体的重组菌发酵产酶过程: 种子活化至诱导前操作与 pGEX-6P-1 为表达载体的重组菌相

同, pCOLDI 表达载体的启动子为 CSPA 冷启动子, 低温 15 °C 诱导, 不需添加诱导剂 IPTG。

以 *Bacillus subtilis* 168 为表达宿主、pP43NMK 为表达载体的重组菌发酵产酶过程: 载体启动子为组成型 P43 启动子, 不需要其他因子的诱导即可稳定地表达, 待发酵培养基中菌体生长至稳定期即可停止发酵。

1.5 分析方法

1.5.1 ThiO 可溶性表达的鉴定

对发酵诱导的菌液 12 000 r/min 离心 20 min, 保留沉淀弃上清, 使用 pH 值 8.0 的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗涤 1 次, 离心弃上清。再加入磷酸缓冲液重悬, 对悬浮液进行超声破碎, 离心后分离上清与沉淀, 沉淀用等量磷酸缓冲液重悬。重悬过后的沉淀悬浮液与分离上清分别与 SDS 缓冲液进行混合, 沸水浴 10 min 进行蛋白变性处理。通过 SDS-PAGE 电泳检测上清样品与沉淀样品中蛋白的可溶性表达情况。

1.5.2 乙醛酸含量的测定

采用高效液相色谱法(HPLC)来检测反应液中产物乙醛酸的含量。本研究使用 Waters 高效液相色谱仪, Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 9 μm), 流动相是超声脱气过膜处理后的 50 mmol/L 稀硫酸。全细胞转化反应液经过 12 000 r/min 离心 5 min 后保留上清液, 使用 0.22 μm 孔径的滤头过滤, 得到滤液为待测样品。检测条件设置为: 进样量 10 μL, 流速 0.6 mL/min, 柱温 35 °C, 紫外检测波长为 210 nm, 样品的进样时间设置为 25 min。

1.5.3 温度对全细胞催化活性及稳定性的影响

全细胞催化反应分别在 pH 值 8.0、温度 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 °C 的条件下进行, 以本次实验所有样品中最高活性作为相对酶活 100%, 比较得到全细胞催化的最适反应温度; 菌体分别在 25, 30, 35, 40, 45 °C 下保温 8 h, 每隔 1 h 取样, 在 25 °C、pH 值 8.0 条件下测定残余活性, 其中定义全细胞催化原始活力为最高相对酶活 100%。

1.5.4 pH 值对全细胞催化活性及稳定性的影响

全细胞催化反应分别在温度 25 °C、pH 值 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 7.8, 8.0, 8.3, 8.5, 9.0, 9.5 的 10 个不同缓冲液中进行。pH 值 6.0~8.0 范围内使用 50 mmol/L 磷酸缓冲液; pH 值 8.0~9.5 范围内使用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。以本次实验所有样品中最高活性作为相对酶活 100%,

比较得到全细胞催化的最适反应 pH 值。菌体分别在 pH 值 7.0, 7.5, 8.3, 8.5, 9.0 下保温 8 h, 每隔 1 h 取样, 在 25 ℃、pH 值 8.0 条件下测定残余活性, 其中定义全细胞催化原始活力为最高相对酶活 100%。

2 结果与讨论

2.1 ThiO 表达菌株的构建及转化生产乙醛酸

提取经过 ThiO 基因片段扩增、酶切连接和筛选验证等分子操作构建成功的重组质粒。将重组质粒 pET-28a(+)-ThiO 转化入 *E.coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 经卡那霉素 LB 平板筛选; 将重组质粒 pGEX-6P-1-ThiO、pCOLDI-ThiO 转化入 *E.coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 经氨苄霉素 LB 平板筛选; 将重组质粒 pP43NMK-ThiO 转化入 *Bacillus subtilis* 168 感受态细胞, 经卡那霉素 LB 平板筛选, 见表 2。挑取阳性克隆子, 经过菌落 PCR 验证获得包含 ThiO 基因的 4 株表达菌株: *E.coli* BL21(pET-28a(+)-ThiO)、*E.coli* BL21(pGEX-6P-1-ThiO)、*E.coli* BL21(pCOLDI-ThiO) 及 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO)。

表 2 表达菌株的构建

Tab.2 Construction of expression strains

序号	表达宿主	重组质粒	抗性
1	<i>E.coli</i> BL21(DE3)	pET-28a(+)-ThiO	Kana ^r
2		pGEX-6P-1-ThiO	Amp ^r
3		pCOLDI-ThiO	Amp ^r
4	<i>Bacillus subtilis</i> 168	pP43NMK-ThiO	Kana ^r

对菌株 *E.coli* BL21(pET-28a(+)-ThiO)、*E.coli* BL21(pGEX-6P-1-ThiO) 进行发酵培养, 菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6 时, 添加终浓度 1% 的诱导剂 IPTG, 在 25 ℃ 条件下进行诱导表达; 对 *E.coli* BL21(pCOLDI-ThiO) 进行发酵培养, 在低温 15 ℃ 条件下进行诱导表达; 对菌株 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO) 进行发酵培养。将上述 4 株重组菌株菌液进行离心处理, 并收集菌体, 用 PBS 缓冲液洗涤两次后, 保存起来作为全细胞催化剂。在 pH 值 8.0 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液中 (20 mL 总体积) 添加 10 g/L 的底物甘氨酸以及 20 g/L 的全细胞催化剂, 在 25 ℃、200 rpm 条件下反应 12 h, 检测 4 株菌株全细胞转化生产乙醛酸的效果, 结果见图 2。发现

菌株 *E.coli* BL21(pET-28a(+)-ThiO)、*E.coli* BL21(pGEX-6P-1-ThiO)、*E.coli* BL21(pCOLDI-ThiO)、*Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO) 的乙醛酸产量分别为 0.15±0.02, 0.18±0.03, 0.16 g±0.02, 1.50±0.03 g/L, 产量 1.50±0.03 g/L 是目前生物法生产乙醛酸最高产量的 2 倍^[6]。

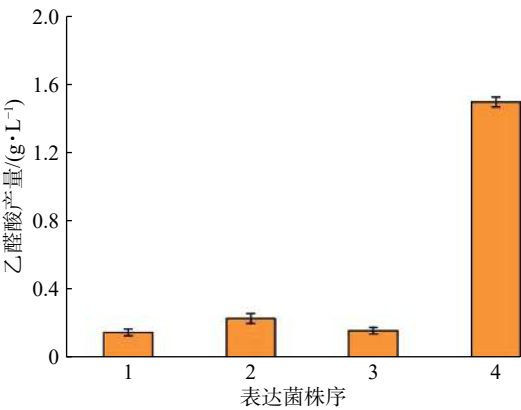


图 2 4 株表达菌株全细胞转化生成乙醛酸的产量

Fig.2 Production of glyoxylic acid by whole cell transformation of four expression strains

进一步分析, 以 *E.coli* BL21 为表达宿主的 3 株表达菌株转化生产乙醛酸的产量较低, 其原因是 ThiO 的表达以包涵体的形式存在。带有 N-GST 促溶标签^[16] 的菌株 *E.coli* BL21(pGEX-6P-1-ThiO)、带有低温诱导促进蛋白正确折叠的 CSPA 冷启动子的菌株 *E.coli* BL21(pCOLDI-ThiO) 相比于带有 T7 启动子的菌株 *E.coli* BL21(pET-28a(+)-ThiO) 并没有取得促进 ThiO 的可溶性表达的效果; 而菌株 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO) 则是可溶性表达。因此, 菌株 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO) 转化生产乙醛酸的效率较高, *Bacillus subtilis* 168 更适合作为 ThiO 的表达宿主, 用于后续研究。

2.2 菌株 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO) 的可溶性表达

全细胞裂解液 SDS-PAGE 电泳检测如图 3 所示。其中: M 代表蛋白质分子量标准; 1 代表菌体破碎上清; 2 代表菌体破碎沉淀。SDS-PAGE 电泳显示, 菌株 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO) 菌体破碎上清液中, 分子量 44 kDa 大小附近有明显的蛋白亮条带 (图 3 中的条带 1), 与文献 [7] 中报道的 ThiO 分子量大小一致; 菌体破碎沉淀样品中没有蛋白亮条带 (图 3 中的条带 2), 表明 ThiO 在菌株 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO) 中成功实现了胞内可溶性表达。菌株 *Bacillus subtilis*

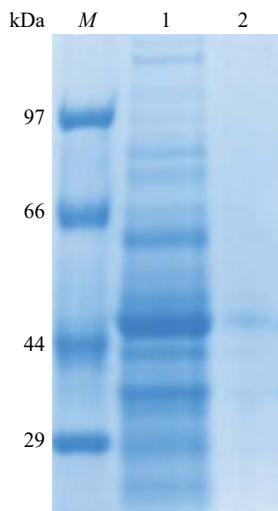


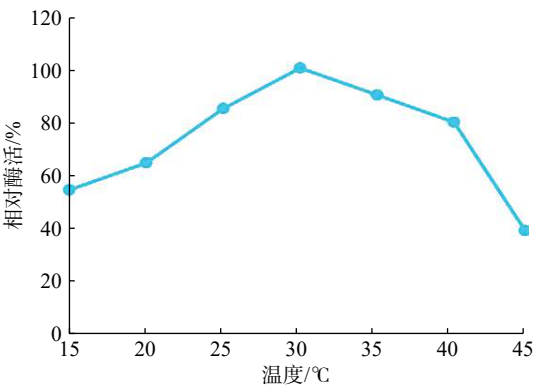
图3 SDS-PAGE电泳检测全细胞裂解液

Fig.3 SDS-PAGE analysis of whole cell lysates

168(pP43NMK-ThiO)的菌体可作为转化甘氨酸生产乙醛酸的全细胞催化剂。

2.3 菌株 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO)的最优转化条件

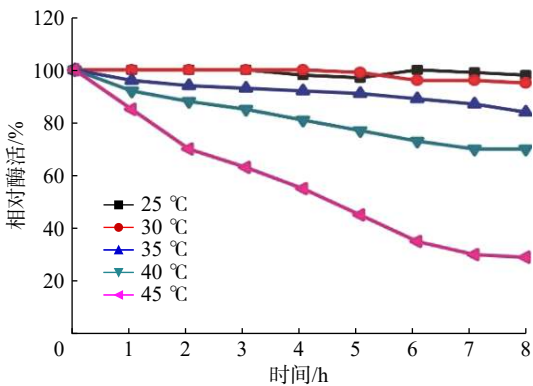
温度(15~45℃)对 ThiO 酶活的影响如图 4(a)



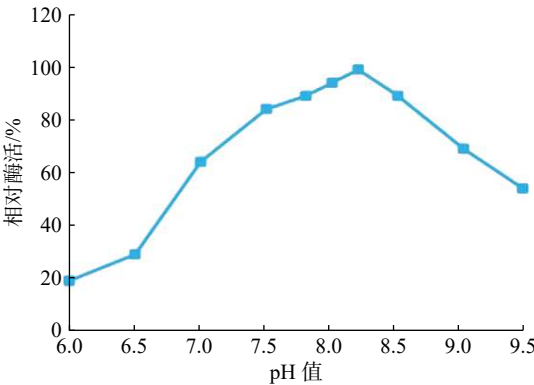
(a) 温度对全细胞催化剂的影响

所示。随着温度从 15℃ 增加至 30℃，ThiO 酶活逐渐上升达到最高值 100%；继续增加温度(≥30℃)，酶活则逐渐降低；45℃ 时酶活为 40%。不同温度对全细胞催化剂热稳定性的影响如图 4(b)所示，在 25℃ 和 30℃ 下保温 8 h，全细胞催化剂基本不损失活性；而温度增加至 35、40、45℃，保温 8 h 后，酶活仅为 90%、75%、30%。这一结果表明，全细胞催化剂在 35℃ 内能保持较高的酶活和热稳定性，与 ThiO 纯化分离后温度相关的活性研究相吻合^[7]，适合工业化长时间催化。因此，*Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO)全细胞催化剂的最佳转化为温度 30℃。

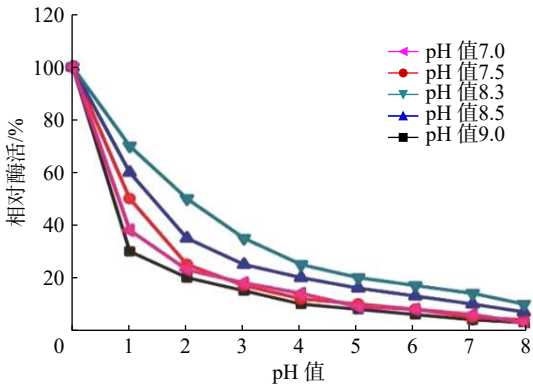
反应体系中 pH 值直接影响与底物的结合，所以最适 pH 值是全细胞催化剂重要的生物特性之一^[18-20]。实验探究了 *Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO)全细胞催化剂在 pH 值 6.0~9.5 范围内的酶活变化，如图 4(c)所示。在 pH 值为 6.0~6.5 时，全细胞催化剂残留 20% 活性，基本丧失转化能力；在 pH 值为 7.0~9.0 时，酶活先上升、后下降，保持 60% 以上活性；在 pH 值为



(b) 温度稳定性



(c) pH 值对全细胞催化剂的影响



(d) pH 值稳定性

图4 *Bacillus subtilis* 168 (pP43NMK-ThiO) 全细胞催化剂最适反应条件及稳定性

Fig.4 Optimal reaction conditions and stability for whole cell catalyst of *Bacillus subtilis* 168 (pP43NMK-ThiO)

8.0~8.5时,保持90%以上高活性;在pH值为8.3时,达到100%最高活性。本实验同时在pH值7.0~9.0范围内考察了全细胞催化剂8 h内pH值的稳定性,得到随时间变化的活性曲线,如图4(d)所示。在pH值8.3的最佳条件下,1 h后活性下降至75%;1 h~5 h间活性迅速下降,残留25%的活性;5 h后活性随时间缓慢下降至完全丧失。从整体分析,*Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO)全细胞催化剂的pH值稳定性不佳,在缓冲体系中会逐渐失活,最终完全丧失转化能力。关于ThiO的pH值稳定性研究中也存在3 h后酶活仅残留30%的报道^[15]。相对而言,pH值8.3时全细胞催化剂的稳定性最好,为最佳转化pH值。

2.4 外源物质添加对乙醛酸转化的影响

外源物(通透剂和过氧化氢酶)添加对乙醛酸转化的影响结果如图5所示。其中:1指优化条件下空白对照组;2指添加CTAB组;3指添加X-100组;4指添加吐温-80组;5指添加过氧化氢酶组。在温度为30℃、pH值为8.3的最佳转化条件下,反应初始时添加1%的CTAB,X-100和吐温-80时,乙醛酸产量为 1.52 ± 0.03 , 1.45 ± 0.02 , 1.51 ± 0.03 g/L,均低于对照组(1.82 ± 0.01 g/L)。而添加1%过氧化氢酶,则使乙醛酸产量提高到 1.95 ± 0.03 g/L,达到当前生物法生产乙醛酸最高产量的2.6倍。其原因在于副产物过氧化氢对细胞有毒害作用,而添加过氧化氢酶消除了部分过氧化氢,使得乙醛酸的产量得到提高。

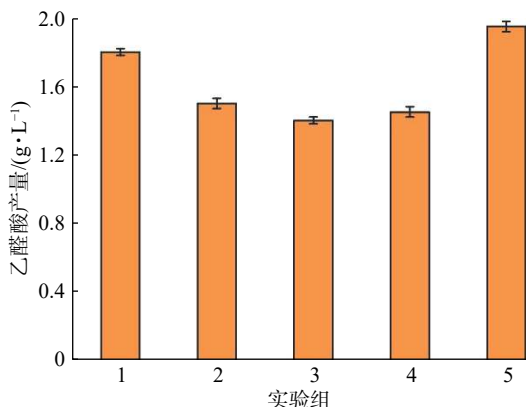


图5 外源物添加对乙醛酸产量的影响

Fig.5 Effect of additives on glyoxylic acid production

2.5 乙醛酸的规模化制备

将全细胞转化放大至3 L发酵罐上进行乙醛酸的规模化制备。转化体系设置为50 g/L的甘氨酸、20 g/L的全细胞催化剂,控制反应条件在温度为

30℃、pH值8.3、通气1 vvm、搅拌转速500 rpm,反应12 h。转化过程曲线如图6所示。3 h以内,乙醛酸产量迅速积累至7 g/L;当转化进行到11 h时,乙醛酸产量达到最大值 9.75 ± 0.13 g/L,转化率为19.5%,转化效率与摇瓶转化结果一致,且到达最大产量的时间相比摇瓶减少了3 h,其原因是由于发酵罐具有良好的搅拌和溶氧性能;转化进行到12 h时,乙醛酸的产量总体保持稳定。这有利于今后乙醛酸的工业化生产。

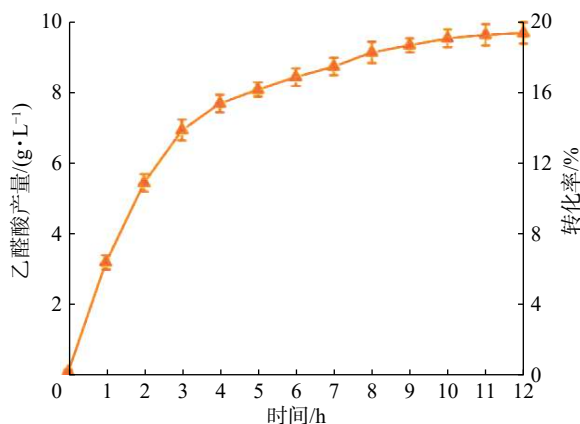


图6 乙醛酸放大体系转化生产过程

Fig.6 Production process of glyoxylic acid conversion system

3 结 论

从表达宿主和表达载体角度出发,构建了4株甘氨酸氧化酶重组菌株。实验转化结果显示*Bacillus subtilis* 168更适合作为ThiO的表达宿主。菌株*Bacillus subtilis* 168(pP43NMK-ThiO)实现了甘氨酸氧化酶胞内可溶性表达。并首次报道利用菌体全细胞转化甘氨酸制备乙醛酸,产量超越了当前生物法生产乙醛酸的最高产量。通过对反应条件优化及向反应体系中添加过氧化氢酶,使得产量进一步提升。在3 L罐上进行了放大体系实验,显示出稳定的转化效果,为全细胞法制备乙醛酸的工业化奠定了基础。

参考文献:

- [1] 李涛. 乙醛酸的生产及市场应用 [J]. 精细化工原料及中间体, 2008(8): 9-14.
- [2] 魏国峰, 张正春, 张坤, 等. 香兰素及其乙醛酸法合成工艺技术 [J]. 石油科技论坛, 2011, 30(6): 63-65.
- [3] 韩凤. DL-对羟基苯甘氨酸的制备研究 [J]. 医药论坛杂志, 2010, 31(20): 4-5, 8.

- [4] 郭小芳. 贵金属催化剂 (Au, Pd, Pt) 催化乙二醛选择氧化合成乙醛酸的研究 [D]. 内蒙古: 内蒙古师范大学, 2016.
- [5] 周新军. 乙醛酸的制备研究进展 [J]. 乙醛醋酸化工, 2017(2): 16–24, 8.
- [6] LI L K, SHI L L, HONG P H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of glyoxylate from xylose[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 129: 113–118.
- [7] NISHIYA Y, IMANAKA T. Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*[J]. *FEBS Letters*, 1998, 438(3): 263–266.
- [8] PEDOTTI M, GHISLA S, MOTTERAN L, et al. Catalytic and redox properties of glycine oxidase from *Bacillus subtilis*[J]. *Biochimie*, 2009, 91(5): 604–612.
- [9] TATSUMI M, HOSHINO W, KODAMA Y, et al. Development of a rapid and simple glycine analysis method using a stable glycine oxidase mutant[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 587: 113447.
- [10] MARTÍNEZ-MARTÍNEZ I, NAVARRO-FERNANDEZ J, LOZADA - RAMÍREZ J D, et al. Maximization of production of his-tagged glycine oxidase and its M261 mutant proteins[J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(3): 647–652.
- [11] 张宇萌, 童梅, 陆小冬, 等. 提高大肠杆菌可溶性重组蛋白表达产率的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(5): 118–124.
- [12] 张真, 汪燕, 马振刚. 提高大肠杆菌重组蛋白可溶性表达方法研究进展 [J]. *广东蚕业*, 2019, 53(7): 37–40.
- [13] WU G B, ZHAN T, GUO Y M, et al. Asn336 is involved in the substrate affinity of glycine oxidase from *Bacillus cereus*[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2016, 22: 26–30.
- [14] ZHANG K, GUO Y M, YAO P, et al. Characterization and directed evolution of BliGO, a novel glycine oxidase from *Bacillus licheniformis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 85: 12–18.
- [15] MARTÍNEZ-MARTÍNEZ I, NAVARRO-FERNÁNDEZ J, GARCÍA-CARMONA F, et al. Implication of a mutation in the flavin binding site on the specific activity and substrate specificity of glycine oxidase from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 133(1): 1–8.
- [16] 吴珊珊, 朱芸, 陈珊珊, 等. 融合标签在蛋白质可溶性表达中的应用进展 [J]. 化工进展, 2014, 33(4): 993–998.
- [17] MOLLA G, MOTTERAN L, JOB V, et al. Kinetic mechanisms of glycine oxidase from *Bacillus subtilis*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(7): 1474–1482.
- [18] 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.
- [19] 万红贵, 赵宗松, 蒋导航, 等. 微生物全细胞催化技术在工业生产中的应用 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(4): 1917–1919, 1955.
- [20] 杨玉凤, 费理文, 李建华, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成莱鲍迪昔 D[J]. *工业微生物*, 2017, 47(5): 1–7.

(编辑: 董 伟)