基于天冬氨酸的多酶级联反应合成亚精胺

刘康宁，杨新超，叶春江*

（济南大学生命科学与技术学院, 山东济南 250022）

摘要：为降低亚精胺合成的底物成本，研究自天冬氨酸起始体外合成亚精胺的可行性，并尝试在体外构建多酶级联催化体系合成亚精胺。研究通过基因编辑的方式在大肠杆菌中过表达来自大肠杆菌的天冬氨酸激酶（Aspartate Kinase，AK），天冬氨酸半醛脱氢酶（Aspartic-*β*-hydroxamate Dehydrogenase, ASADH）以及来自 *Agrobacterium fabrum str. C58* 的羧基亚精胺脱氢酶（Carboxyspermidine Dehydrogenase, CASDH）和来自 *Campylobacter jejuni 81116* 的羧基亚精胺脱羧酶（Carboxyspermidine Decarboxylase, CASDC）并从中获得粗酶液。在体外构建多酶级联催化系统，并以天冬氨酸和腐胺为原料，合成亚精胺。探究了影响酶表达条件的因素，包括诱导时的 OD_{600}、IPTG 终浓度、诱导温度和诱导时间。同时对天冬氨酸激酶与天冬氨酸半醛脱氢酶的酶学性质，包括其最适温度、温度稳定性、最适 pH 值和对金属离子的依赖性。通过优化后的系统，最终以 0.44 g·L^{-1}（5 mmol·L^{-1}）腐胺和 0.665 g·L^{-1}（5 mmol·L^{-1}）天冬氨酸为原料合成了 12.72 mg·L^{-1} 亚精胺。研究证明通过体外多酶级联的方式以相对廉价的天冬氨酸为底物合成亚精胺具有可行性。为进一步研究亚精胺的生物合成提供了理论基础。

关键词：亚精胺；生物转化；多酶级联催化系统；大肠杆菌

文章编号：1673-9078(2026)10-75-85 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1743

Synthesis of Spermidine via An Aspartic Acid-based Multi-enzyme Cascade Reaction

LIU Kangning, YANG Xinchao, YE Chunjiang*

(School of Biological Science and Technology, University of Ji'nan, Ji'nan 250022, China)

Abstract: To reduce the substrate cost of spermidine synthesis, the feasibility of synthesizing spermidine *in vitro* from aspartic acid was investigated, and a multi-enzyme cascade catalytic system for *in vitro* spermidine synthesis was constructed. Through gene editing, aspartate kinase (AK) and aspartic-*β*-hydroxamate dehydrogenase (ASADH) from *Escherichia coli*, carboxyspermidine dehydrogenase (CASDH) from *Agrobacterium fabrum str. C58*, and carboxyspermidine decarboxylase (CASDC) from *Campylobacter jejuni 81116* were overexpressed in *E. coli* to obtain the crude enzyme solution. Spermidine was successfully synthesized *in vitro* from aspartic acid and putrescine using a multi-enzyme cascade catalytic system. The factors influencing enzyme expression conditions, namely OD_{600} at induction, final IPTG concentration, induction temperature, and induction duration, were systematically investigated. Concurrently, the enzymatic properties of AK and ASADH, including optimal temperature, thermal stability, optimal pH, and metal-ion dependence, were comprehensively characterized. Using the optimized system, 12.72 mg·L^{-1} spermidine was ultimately synthesized from 0.44 g·L^{-1} (5 mmol·L^{-1}) putrescine and 0.665 g·L^{-1} (5 mmol·L^{-1}) aspartic acid feedstocks. The feasibility of spermidine synthesis from inexpensive aspartic acid via an *in vitro* multi-enzyme cascade was demonstrated. This study provides valuable insights for further research on the *in vitro* production of spermidine.

Key words: spermidine; bioconversion; multi-enzyme cascade catalytic system; *Escherichia coli*

引文格式：

刘康宁,杨新超,叶春江.基于天冬氨酸的多酶级联反应合成亚精胺[J].现代食品科技,2026,42(10):75-85.

LIU Kangning, YANG Xinchao, YE Chunjiang. Synthesis of spermidine via an aspartic acid-based multi-enzyme cascade reaction [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 75-85.

收稿日期：2025-12-05；修回日期：2026-02-08；接受日期：2026-02-12

基金项目：横向课题（W2024524）

作者简介：刘康宁（2001-），男，硕士研究生，研究方向：生物技术与应用，E-mail：ylicy0701@163.com

通讯作者：叶春江（1972-），男，博士，副教授，研究方向：生物技术与应用，E-mail：chm_yecj@ujn.edu.cn

亚精胺（Spermidine, SPD），又称精脒、*N*-(3-氨基丙基)-1,4-丁二胺，是一种典型的三胺类多胺物质，广泛存在于小麦、大豆等植物，酵母菌、乳酸菌等微生物以及各种动物组织中[1,2]。亚精胺最早发现于人的精液中[3]，至1888年正式被命名为亚精胺[4]。亚精胺具有调控细胞增殖、分化、凋亡、信号传递及基因表达等活动的功能[5,6]，并具有延缓生物体的衰老[7]、保护心血管系统[8]、神经调节及神经保护[9]、改善代谢综合症状、以及降低肿瘤发生概率的作用[10]。此外对于植物体而言，亚精胺在植物的生长[11]和应激反应[12]中也存在重要作用。

生物法合成亚精胺目前存在3条已知的合成途径，分别是S-腺苷甲硫氨酸介导的SAM途径[13]和L-天冬氨酸-*β*-半醛（Aspartic-*β*-hydroxamate）介导的ASA途径[14]，以及羧氨基丙基胍丁胺介导的CAPA途径[15]。绝大部分生物依靠SAM途径合成亚精胺，通过甲硫氨酸腺苷转移酶（Methionine Adenosyltransferase）将甲硫氨酸转化成S-腺苷甲硫氨酸，并在S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶（S-adenosylmethionine Decarboxylase）的作用下转化为脱羧化S-腺苷甲硫氨酸。在亚精胺合酶的作用下将腐胺与脱羧化S-腺苷甲硫氨酸转化为亚精胺[16]。部分以ASA途径合成亚精胺的生物体，通过天冬氨酸激酶（Aspartate Kinase, AK）与天冬氨酸半醛脱氢酶（Aspartic-*β*-hydroxamate Dehydrogenase，ASADH）将天冬氨酸转化为L-天冬氨酸-*β*-半醛，借由羧基亚精胺脱氢酶（Carboxyspermidine Dehydrogenase, CASDH）将L-天冬氨酸-*β*-半醛与腐胺转化为羧基亚精胺，随后经羧基亚精胺脱羧酶（Carboxyspermidine Decarboxylase, CASDC）脱羧化作用产生亚精胺[17,18]。近年来发现了一种全新的CAPA途径，由精氨酸脱羧酶催化精氨酸转化为胍基丁胺代替腐胺与L-天冬氨酸-*β*-半醛反应，并在羧氨基丙基胍丁胺脱氢酶的作用下使二者转化为羧氨基丙基胍丁胺。通过羧氨基丙基胍丁胺脱羧酶与氨丙基胍丁胺尿素水解酶的进一步作用生成亚精胺[15]。

目前生物法合成亚精胺的主要方法是通过SAM途径[13]。Liu等[19]筛选了一种来自玉米的S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶与过表达的大肠杆菌亚精胺合酶组成双酶级联系统，用于从腐胺与S-腺苷甲硫氨酸起始体外生产亚精胺。该方法需要使用昂贵的S-腺苷甲硫氨酸，成本极高。Liang等[20]研究了一种特殊的高丝氨酸脱氢酶，可以将高丝氨酸氧化为天冬氨酸-*β*-半醛，用于从L-高丝氨酸和腐胺合成亚精胺。通过共表达高丝氨酸脱氢酶、羧基亚精胺脱氢酶和羧基亚精胺脱羧酶，设计并构建了一种具有NADPH自给循环的亚精胺生物合成方法[21]。该方法通过L-高丝氨酸代替S-腺苷甲硫氨酸，在一定程度上降低了生产成本。本研究以大肠杆菌为表达系统，以天冬氨酸和腐胺为原料，在体外构建多酶级联催化系统合成亚精胺，进一步降低亚精胺合成的底物成本。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酵母粉、蛋白胨、甲醇、乙腈，赛默飞世尔科技公司；琼脂粉，北京索莱宝科技有限公司；2 mol·L^{-1} 羟胺溶液，上海源叶生物科技有限公司；氯化铁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钾，国药集团化学试剂有限公司；硫酸卡那霉素，北京索莱宝生化试剂有限公司；NADPH、NADH、磷酸吡哆醛、腐胺、四环素、氯霉素、L-阿拉伯糖，上海麦克林生化科技股份有限公司；ATP、亚精胺，上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

ZHTY-50S震荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；DXL60A全自动高压蒸汽灭菌锅，山东德祥仪器有限公司；DRHH-S4数显恒温水浴锅，上海双捷实验设备有限公司；UV-5100B紫外可见分光光度计，上海元析仪器有限公司；iCEN2高速冷冻离心机，杭州奥盛仪器有限公司；FA1104电子天平，上饶市鸿翔实业有限公司；MVS-1旋涡混合器，北京金北德工贸有限公司；1510-01653酶标仪、UlltiMate3000液相色谱仪，赛默飞世尔科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基

本研究中使用的菌株列于表1中。菌株在添加卡那霉素（Kan，50 mg·L^{-1}）或氯霉素（Cm，34 mg·L^{-1}）的LB培养基（10 g·L^{-1} 蛋白胨，5 g·L^{-1} 酵母粉和10 g·L^{-1} 氯化钠，pH值7.2）或TB培养基（磷酸二氢钾16.4 g·L^{-1}，磷酸氢二钾2.3 g·L^{-1}，酵母粉24 g·L^{-1}，胰蛋白胨12 g·L^{-1}，pH值7.0）中培养。

1.3.2 质粒构建

本研究中所用的质粒见表1。

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株 / 质粒	描述	来源
E.coli strains BL21(DE3)	用作宿主菌	BioSci
pET30a-CASDH	携带基因 CASDH 的 pET30a 质粒	全基因合成
pRSFDuet-CASDC	携带基因 CASDC 的 pRSFDuet 质粒	全基因合成
pET30a-AK	携带基因 AK 的 pET30a 质粒	全基因合成
pET30a-ASADH	携带基因 ASADH 的 pET30a 质粒	全基因合成
ES1	携带质粒 pET30a-AK 的大肠杆菌 BL21(DE3)	本研究构建
ES2	携带质粒 pET30a-ASADH 的大肠杆菌 BL21(DE3)	本研究构建
ES3	携带质粒 pET30a-CASDH 的大肠杆菌 BL21(DE3)	本研究构建
ES4	携带质粒 pRSFDuet-CASDC 的大肠杆菌 BL21(DE3)	本研究构建
ES3-1	携带质粒 pET30a-CASDH 和 pG-KJE8 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES3-2	携带质粒 pET30a-CASDH 和 pGro7 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES3-3	携带质粒 pET30a-CASDH 和 pKJE7 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES3-4	携带质粒 pET30a-CASDH 和 pG-Tf2 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES3-5	携带质粒 pET30a-CASDH 和 pTf16 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES4-1	携带质粒 pRSFDuet-CASDC 和 pG-KJE8 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES4-2	携带质粒 pRSFDuet-CASDC 和 pGro7 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES4-3	携带质粒 pRSFDuet-CASDC 和 pKJE7 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES4-4	携带质粒 pRSFDuet-CASDC 和 pG-Tf2 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
ES4-5	携带质粒 pRSFDuet-CASDC 和 pTf16 的大肠杆菌 BL21 (DE3)	本研究构建
pG-KJE8	含有分子伴侣基因 *dna*K-*dna*J-*grp*E、*gro*ES-*gro*EL 的 pACYC 质粒	TaKaBa
pGro7	含有分子伴侣基因 *gro*ES-*gro*EL 的 pACYC 质粒	TaKaBa
pKJE7	含有分子伴侣基因 *dna*K-*dna*J-*grp*E 的 pACYC 质粒	TaKaBa
pG-Tf2	含有分子伴侣基因 *gro*ES-*gro*EL-tig 的 pACYC 质粒	TaKaBa
pTf16	含有分子伴侣基因 Tig 的 pACYC 质粒	TaKaBa

注：全基因合成委托杭州宝赛生物进行。所用基因 NCBI 编号分别为：AK，AP009048.14235474-4236823 (-)；ASADH，NC_000913.3-3573775-3574878 (-)；CASDH，AAK89265.1；CASDC，WP_002877469.1。

1.3.3 重组蛋白在大肠杆菌BL21（DE3）中的表达

重组菌株 ES1、ES2、ES3、ES4 的甘油管按 2%（φ）的接种量接种至 50 mL LB 培养基中。37 ℃活化 12 h，按 1%（φ）的接种量接入 100 mL 含有 Kan 或 Amp 的 LB 培养基中。当 OD_{600} 达到 0.9 时，用 0.4 mmol·L^{-1} IPTG 诱导菌株，并在 20 ℃、200 r·min^{-1} 条件下再培养 20 h。低温离心（8 000 *g*，10 min，4 ℃）收集菌体，最后重悬于 50 mmol·L^{-1} PBS 缓冲液（pH 值 7.4）中。

通过超声波破碎细胞（功率 300 W，脉冲时间工作 3 s，间隔 5 s，处理 20 min），将细胞提取物以 13 000 *g* 离心 3 min 以分离细胞碎片。使用十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析上清液和沉淀。

1.3.4 AK、ASADH酶学性质的测定

将标准反应体系置于不同温度（20~60 ℃）下研究酶的最佳温度。在不同的缓冲液中确定最佳反应 pH 值，所用缓冲液为柠檬酸－柠檬酸钠缓冲液（pH 值 3.0~6.2），磷酸氢二钠－磷酸二氢钠缓冲液（pH 值 5.8~8.0），碳酸钠－碳酸氢钠缓冲液（pH 值 9.2~10.8）。将终浓度为 0.1 mmol·L^{-1} 和 1 mmol·L^{-1} 的 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Ni^{2+}、Fe^{3+} 分别添加到反应体系中以确定金属离子的偏好。

1.3.5 分析方法

1.3.5.1 AK、ASADH活性检测方法

采用羟肟酸－氯化铁检测法[22,23]检验 AK 的活性。称取适量的 L-Asp，配置 38.67 mmol·L^{-1} 的底物母液。称取适量 ATP，配置成 70 mmol·L^{-1} 浓度的辅酶溶液。称取适量 KCl，配置 2.94 mol·L^{-1} 的离子溶液。称取适量羟胺，配置 2 mol·L^{-1} 的羟胺溶液。配置 0.37 mol·L^{-1} $FeCl_3$-0.2 mol·L^{-1} TCA 溶液。测定体系如表 2 所示。

表 2 天冬氨酸激酶活性测定反应体系

Table 2 Reaction system for Aspartate Kinase activity assay

试剂	体积/mL
L-Asp	0.3
ATP	0.1
KCl	0.2
Hydroxylamine	0.2
Tric-HCl（pH 值 8.0）	0.1
AK	0.1

反应条件：按照表 2 所示配置反应体系，室温下反应 10 min，加入 0.37 mol·L^{-1} $FeCl_3$-0.2 mol·L^{-1} TCA 溶液 1 mL 终止反应，离心（9 500 *g*，3 min）取上清。在 540 nm 下测定反应生成的铁－羟肟酸配合物（Iron-hydroxamate Complex）的量来测定 AK 的活性，酶活力单位 U 定义为，在上述条件下，每分钟催化生成 1 μmol 天冬氨酸-*β*-羟肟酸的酶量为一个酶活力单位。

采用 NADPH 检测法[22]检验 ASADH 的活性，称取适量的 NADPH 配置 6 mmol·L^{-1} 的辅酶溶液，其余试剂与 AK 检测所用相同。由于不能购买到 L-天冬氨酸-4-磷酸（4-phospho-L-aspartate）作为 ASADH 的底物，因此将 AK 和 L-Asp 添加至反应体系中，以生成 L-天冬氨酸-4-磷酸。酶活力测定体系如表 3 所示。

表 3 天冬氨酸激酶活性测定反应体系

Table 3 Reaction system for Aspartate-*β*-semialdehyde dehydrogenase activity assay

试剂	体积/mL
L-Asp	0.3
ATP	0.1
KCl	0.2
NADPH	0.05
Tric-HCl（pH 值 8.0）	0.15
AK	0.15
ASA	0.1

按照表 3 所示配置反应体系，室温下反应 10 min，在 340 nm 下检测 NADPH 的吸光消失，来测定 ASADH 活性，酶活力单位 U 定义为，在上述条件下，每分钟催化 1 μmol NADPH 氧化所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.3.5.2 亚精胺检测方法

采用高效液相色谱（HPLC）进行检测。样品通过丹磺酰氯进行衍生，色谱柱：SHIMSEN Superb Ⅱ C18，柱温：30 ℃，流速：1 mL·min^{-1}，流动相 A 为 90% *φ* 乙腈 /10% *φ*（含 0.1% *φ* 乙酸的 0.01 mol·L^{-1} 乙酸铵溶液）流动相 B 为 10% *φ* 乙腈 /90% *φ*（含 0.1% *φ* 乙酸的 0.01 mol·L^{-1} 乙酸铵溶液）[21]。梯度洗脱程序见表 4。

表 4 液相色谱洗脱程序

Table 4 HPLC elution program

组成	时间/min					
	0	22	25	32	32.01	37
流动相 A/%（*φ*）	60	85	100	100	60	60
流动相 B/%（*φ*）	40	15	0	0	40	40

1.4 CASDH、CASDC与分子伴侣的共表达

制备 ES3、ES4 菌株的感受态细胞，将 5 种分子伴侣质粒转化到上述制备的感受态细胞中，37 ℃、200 r·min^{-1} 条件下进行扩大培养。培养至菌液 OD_{600} 为 0.7 时，分别加入终浓度为 0.4 mmol·L^{-1} 的 IPTG，加入 pG-kJE8、pGro7、pKJE7、pTf16 等分子伴侣所需诱导剂 L-阿拉伯糖（终质量浓度 0.5 mg·mL^{-1}）；加入 pG-Tf2、pG-kJE8 所需诱导剂四环素（终质量浓度 5 ng·mL^{-1}）进行诱导表达，诱导条件为 20 ℃、200 r·min^{-1} 振荡培养 20 h。诱导结束后的菌液 4 ℃条件下，8 000 *g* 离心 10 min，弃掉上清，收集沉淀，用一定量的 50 mmol·L^{-1} PBS（pH 值 7.4）缓冲液充分悬浮沉淀，在冰浴条件下进行超声破碎。13 000 *g* 离心 3 min 以分离细胞碎片，利用 SDS-PAGE 检测。

1.5 AK、ASADH表达条件的优化

为了确定影响酶活力的因素，研究了 OD_{600}、IPTG 浓度、温度和诱导时间。所有因素均在 250 mL 锥形瓶中进行优化。

1.6 数据处理

采用 SPSS Statistics 25 软件进行统计学分析，使用 Origin 2021 软件绘制相关图表。

2 结果与讨论

2.1 多酶级联反应系统的构建

如图 1 所示，以天冬氨酸为前体，在天冬氨酸激酶（Aspartate Kinase, AK）和天冬氨酸-*β*-半醛脱氢酶（Aspartic-*β*-hydroxamate Dehydrogenase, ASADH）的催化下可生成天冬氨酸-*β*-半醛，再以腐胺为供体，在羧基亚精胺脱氢酶（Carboxyspermidine Dehydrogenase, CASDH）和羧基亚精胺脱羧酶（Carboxyspermidine Decarboxylase, CASDC）的作用下将其转化为亚精胺。

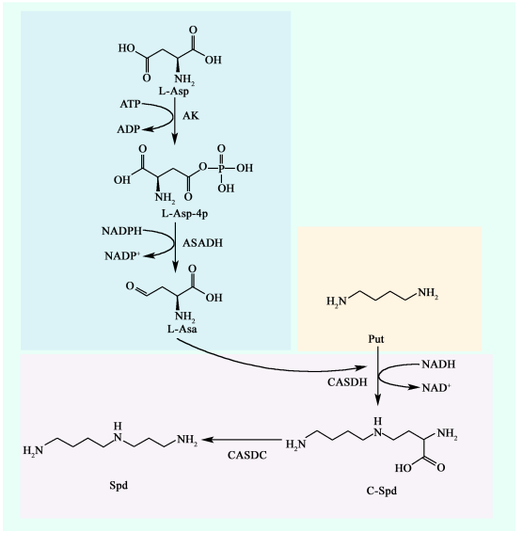


图 1 自天冬氨酸起始的亚精胺生物合成路径

Fig.1 The spermidine biosynthesis pathway initiated from aspartic acid

注：L-Asp：L-天冬氨酸；L-Asp-4p：L-天冬氨酸-4-磷酸；L-Asa：L-天冬氨酸半醛；Put：腐胺；C-Spd：羧基亚精胺；Spd：亚精胺；AK：天冬氨酸激酶；ASADH：天冬氨酸-*β*-半醛脱氢酶；CASDH：羧基亚精胺脱氢酶；CASDC：羧基亚精胺脱羧酶。

构建了过表达 AK 和 ASADH 的大肠杆菌 ES1、ES2 重组菌株，单独表达有利于保证酶在最佳条件下生产，同时有利于后续对酶的添加量进行优化。根据 1.3.3 中诱导方法，对构建完成的重组菌株进行诱导表达，培养、收集重组菌株，超声处理 20 min，得到含有目的蛋白的粗酶液，通过 12 wt.% 的 SDSPAGE 分析蛋白表达情况。如图 2a 所示，AK 和 ASADH 在重组菌株中表达明显。据 1.3.5.1 所述方法，检测 AK、ASADH 的催化活性，如图 2b 所示，AK 酶能够催化 L-天冬氨酸-4-磷酸的产生，证明制备的 AK 酶具有催化活性。如图 2c 所示，ASADH 酶具有明显的氧化 NADPH 的能力，其酶活性约为 240 $U \cdot mL^{-1}$ 证明制备的 ASADH 酶具有催化活性。

在此基础上构建了过表达来自 *Agrobacterium fabrum str. C58* 的 CASDH 和来自 *Campylobacter jejuni 81116* 的 CASDC 的重组菌株[21]，如图 2a 所示，CASDH 和 CASDC 在重组菌株中表达明显。在此基础上将 AK、ASADH、CASDH 和 CASDC 进行偶联，将四种酶的粗酶液加入到底物及辅酶混合物中（天冬氨酸及腐胺 5 $mmol \cdot L^{-1}$，粗酶（以湿菌体计）10 $g \cdot L^{-1}$，ATP/NADH/NADPH/PLP 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$），30 ℃、150 $r \cdot min^{-1}$ 条件下反应 1 h 合成亚精胺。如图 2d 所示，与未添加粗酶的对照组相比，实验组检测到了明显的亚精胺生成，成功获得了亚精胺，初步构建了多酶级联催化合成亚精胺的生物体系。

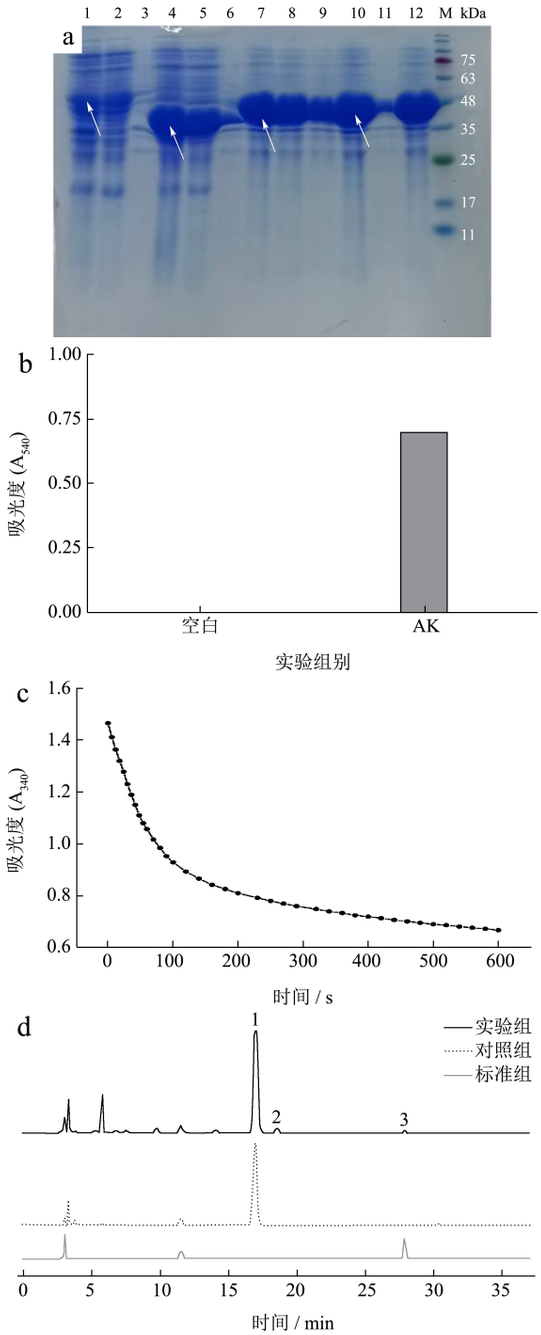


图 2 天冬氨酸激酶和天冬氨酸-*β*-半醛脱氢酶的表达及催化活性验证

Fig.2 Expression and catalytic activity verification of Aspartate Kinase and Aspartate-*β*-semialdehyde dehydrogenase

注：（a）SDS-PAGE，泳道 1、2、3 为 ES1 全菌液、上清、沉淀。泳道 4、5、6 为 ES2 全菌液、上清、沉淀。泳道 7、8、9 为 ES3 全菌液、上清、沉淀。泳道 10、11、12 为 ES4 全菌液、上清、沉淀。泳道 13 为蛋白 maker。（b）AK 酶活性验证（未添加 AK 的空白与添加 AK 的实验组在 540 nm 下的吸光度对比）。（c）ASADH 活性验证（在 ASADH 存在下 NADPH 在 340 nm 下的吸光消失）。（d）HPLC 分析多酶级联催化合成 Spd，1：腐胺，2：羧基亚精胺，3：亚精胺。

2.2 AK和ASADH酶学性质测定

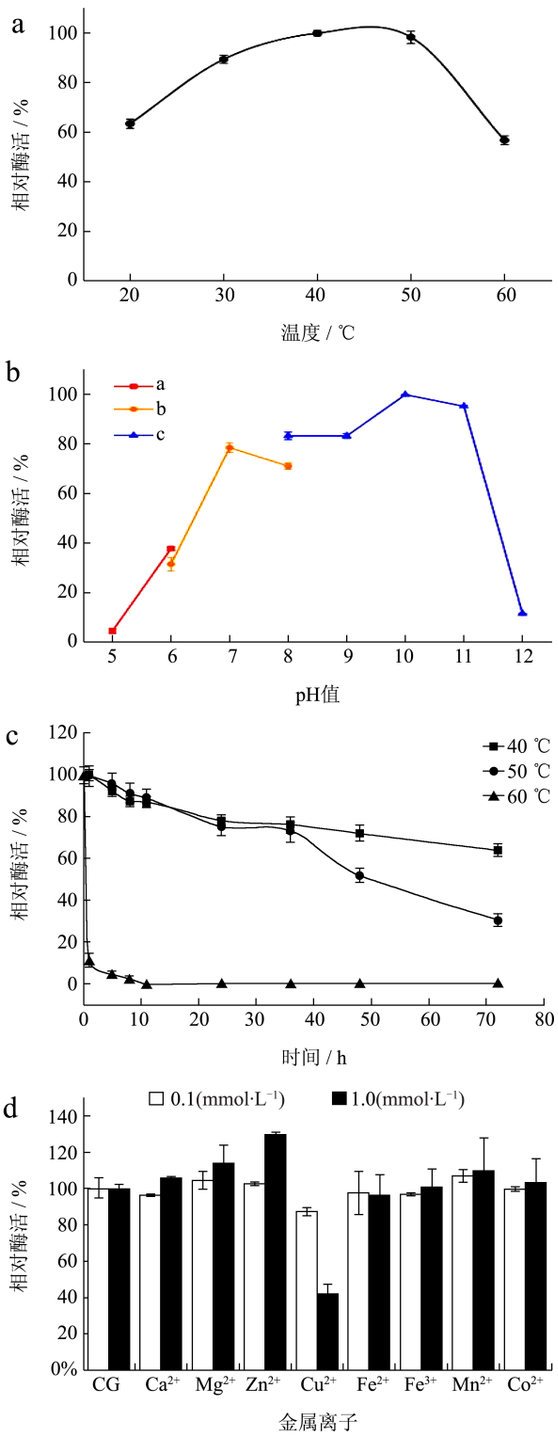


图 3 天冬氨酸激酶的酶学性质

Fig.3 Enzymatic properties of Aspartate Kinase

注:(a)最适温度;(b)最适 pH 值;(c)温度稳定性;(d)金属离子依赖性。图 4 同。

为了提高生物催化剂的催化效率，对天冬氨酸激酶和天冬氨酸-*β*-半醛脱氢酶的酶学性质进行了研究，包括反应最适温度、最适 pH 值、温度稳定性和金属离子依赖性进行了研究。AK 的最适温度在 40 ℃左右（图 3a），ASADH 的最适温度在 20 ℃左右（图 4a）。

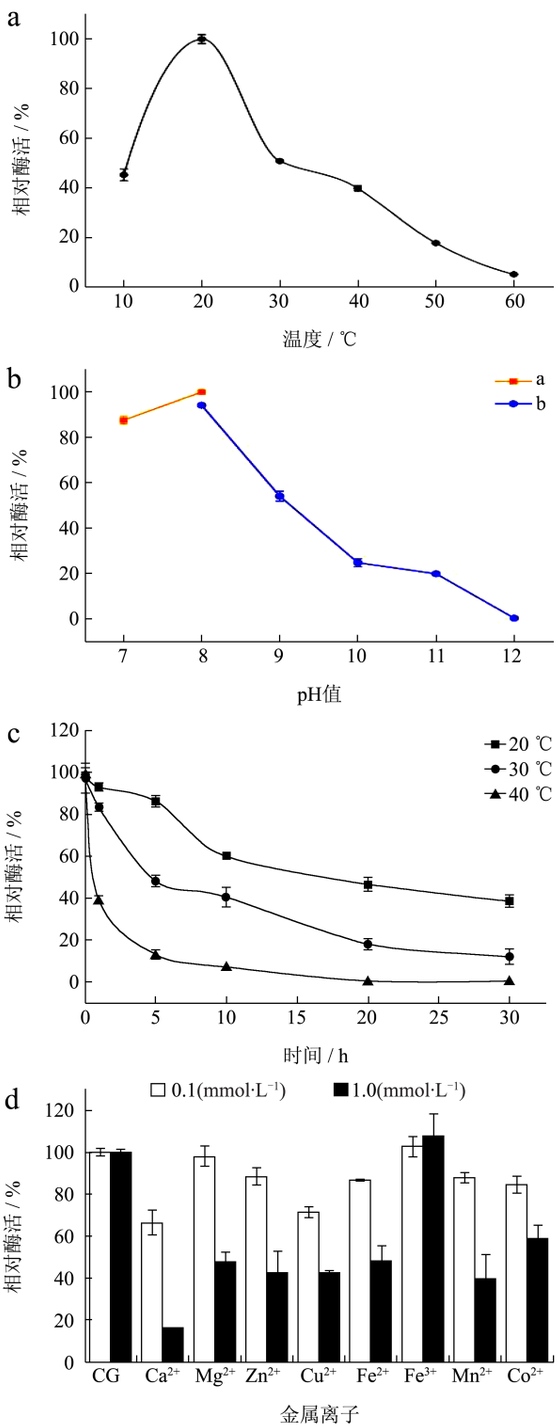


图 4 天冬氨酸-*β*-半醛脱氢酶的酶学性质

Fig.4 Enzymatic properties of Aspartate-*β*-semialdehyde dehydrogenase

对 pH 值的研究表明，AK 在 pH 值 10.0 时达到最

高活性（图 3b），在 pH 值 8~11 时活性能保持在 80% 以上。而 ASADH 在 pH 值 8.0 时达到最高活性（图 4b）。此后随着 pH 值的增加活性迅速下降，至 pH 值 10 时酶活仅剩余 24.51%。AK 在 pH 值 7 时活性为最高酶活性的 78.53%，pH 值 8 时活性为最高酶活性的 83.34%，同时 ASADH 在 pH 值 7 时活性为最高酶活性的 87.50%，pH 值 8 时活性达到最高酶活性，同时考虑 CASDH 的最适 pH 值为 7.5[24]、CASDC 的最适 pH 值为 7[21]，综合考虑，将反应体系的 pH 值定为 7.5。

温度稳定性测试表明，AK 在 40 ℃时比较稳定（图 3c），10 h 内剩余酶活性不低于 80%，50 ℃条件下，AK 在 36 h 内维持 70% 以上的活性。该酶在 60 ℃时不稳定，处理 1 h 后酶活性急剧下降至 11.04%，至 10 h 完全失活。ASADH 对温度较为敏感（图 4c），在 40 ℃条件下 1 h 后酶活仅剩余 39.01%，30 ℃条件下，ASADH 在 10 h 内维持 40% 以上的活性，20 ℃条件下，10 h 内活性在 60% 以上。

大部分金属离子对 AK 的活性呈现正面影响（图 3d），其中 Zn^{2+} 对 AK 有明显激活作用，而 Cu^{2+} 则具有明显抑制作用，经 1 mmol·L^{-1} Cu^{2+} 处理后，AK 活性下降至 41.69%。其它金属离子对于 AK 的影响相对轻微；与 AK 相反，大多数金属离子对 ASADH 有负面影响（图 4d），经 1 mmol·L^{-1} Fe^{3+} 处理后 ASADH 酶活性有小幅度提升，其余金属离子均造成近一半的酶活损失。这些酶学性质的测定将对后续探究亚精胺转化条件提供帮助

2.3 CASDH、CASDC与分子伴侣共表达

研究中发现，所表达的 CASDH 与 CASDC 溶解性较差，有相当一部分酶以不溶性沉淀的形式存在（图 2a），这在很大程度上影响了 CASDH 与 CASDC 粗酶的催化活性。研究表明，分子伴侣能够协助细胞内分子组装，介导其它蛋白质折叠[25]。将分子伴侣与目的蛋白共表达，能够促进过表达的目的蛋白在宿主细胞中的正确折叠，从而提高目的蛋白的可溶性[26]。因此尝试将 CASDH 和 CASDC 与不同的分子伴侣共表达以提高其蛋白的可溶性，并通过 Image J 软件对 CASDH 和 CASDC 与分子伴侣共表达 SDS-PAGE 电泳图进行灰度分析，以测定蛋白的可溶性表达的提高情况。

CASDH 与分子伴侣共表达结果如图 5a 所示。与原始菌株相比，与 pGro7 共表达的菌株可溶 CASDH 产量提高了 12.03%，与其它分子伴侣共表达后 CASDH 的可溶性提高不明显或略有下降。

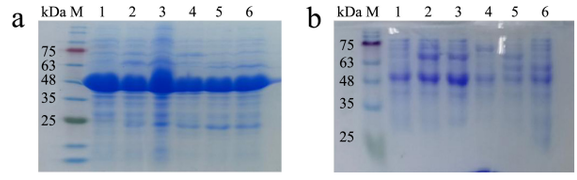


图 5 CASDH、CASDC 与分子伴侣共表达

Fig.5 Co-expression of CASDH, CASDC and molecular chaperones

注：（a）CASDH 与分子伴侣共表达，M：蛋白 maker，泳道 1：ES3，2：ES3-1（pG-KJE8），3：ES3-2（pGro7），4：ES3-3（pKJE7），5：ES3-4（pG-Tf2），6：ES3-5（pTf16）；（b）CASDC 与分子伴侣共表达，M: 蛋白 maker，泳道 1：ES4，2：ES4-1（pG-KJE8），3：ES4-2（pGro7），4：ES4-3（pKJE7），5：ES4-4（pG-Tf2），6：ES4-5（pTf16）。

CASDC 与分子伴侣共表达结果如图 5b 所示。与原始菌株相比，与 pG-KJE8 共表达的菌株可溶 CASDC 产量提高了 36.83%，与 pGro7 共表达的菌株可溶 CASDC 产量提高了 115.92%，与其它分子伴侣共表达后 CASDC 的可溶性提高不明显或略有下降。

2.4 天冬氨酸激酶和天冬氨酸-β-半醛脱氢酶表达条件的优化

为了提高生物催化剂的活性，对天冬氨酸激酶和天冬氨酸-β-半醛脱氢酶的诱导条件，包括诱导 OD_{600}、IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间进行了优化。研究了孵育 OD_{600} 的效果，以优化菌株 ES1 和 ES2 的表达条件。ES1，ES2 的最佳诱导 OD_{600} 为 0.7（图 6a，图 7a），此时单位体积的粗酶活性最高。为了优化 IPTG 浓度，在 IPTG 的终浓度为 0.1~2 mmol·L^{-1} 范围内对 IPTG 添加量进行了研究。ES1 的 IPTG 的最佳浓度为 0.5 mmol·L^{-1}（图 6b），ES2 的 IPTG 的最佳浓度为 1 mmol·L^{-1}（图 7b）。随着浓度的增加，单位质量粗蛋白酶活性逐渐降低。ES1 的最佳诱导温度为 16 ℃（图 6c）。该菌株产酶能力受诱导温度影响较大，随着诱导温度的升高酶活性迅速下降。ES2 的最佳诱导温度为 20 ℃（图 7c）。最后，在之前优化的条件下，在 10~30 h 的培养时间范围内来优化诱导时间。如图所示，ES1 的最佳诱导时间为 20 h（图 6d），ES2 在诱导 15 h 后达到最高单位粗蛋白酶活性（图 7d）。

2.5 基于天冬氨酸的亚精胺转化实验

转化反应体系如表 5 所示，按照表 5 所述配置 20 mL 转化体系，并控制反应温度 30 ℃，反应转速为 150 r·min^{-1}。反应 3 h 后，将转化液于沸水浴中煮沸 3 min，离心取上清作为样品，进行 HPLC 分析。

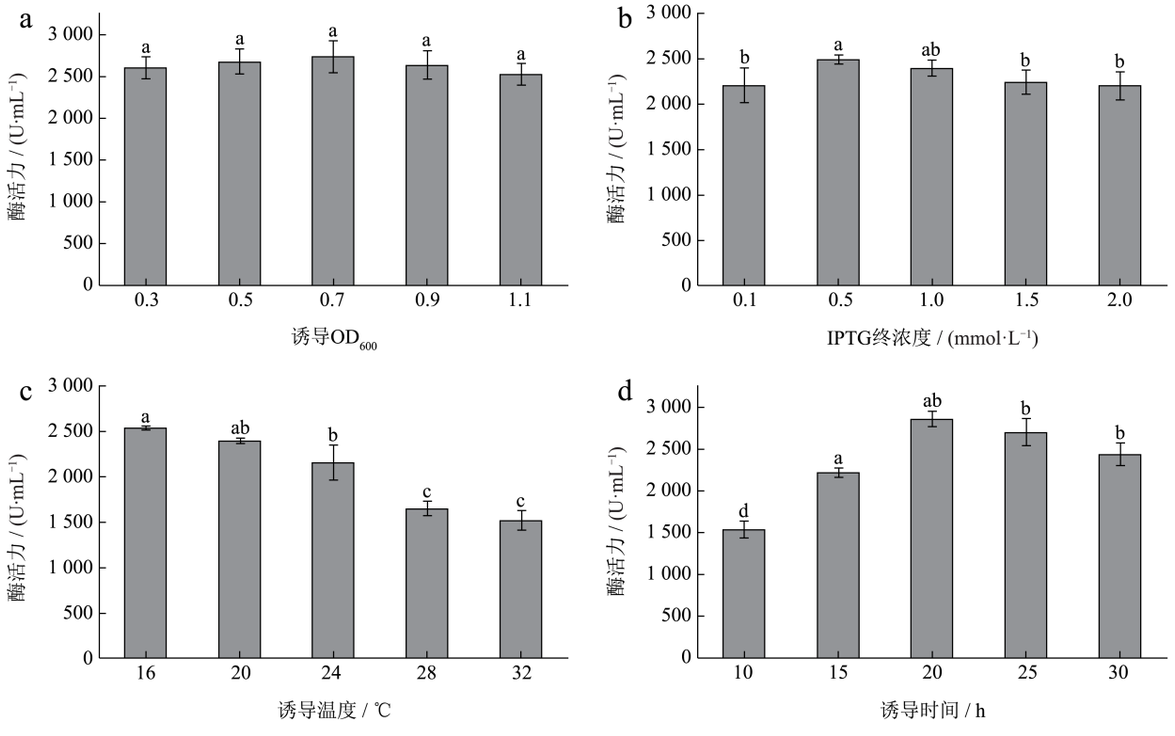


图 6 重组菌株 ES1 培养诱导条件优化

Fig.6 Optimization of induction conditions in cultivation of the recombinant strain ES1

注：图中不同小写字母表示对应组之间具有显著性差异（$P<0.05$）。图 7 同。

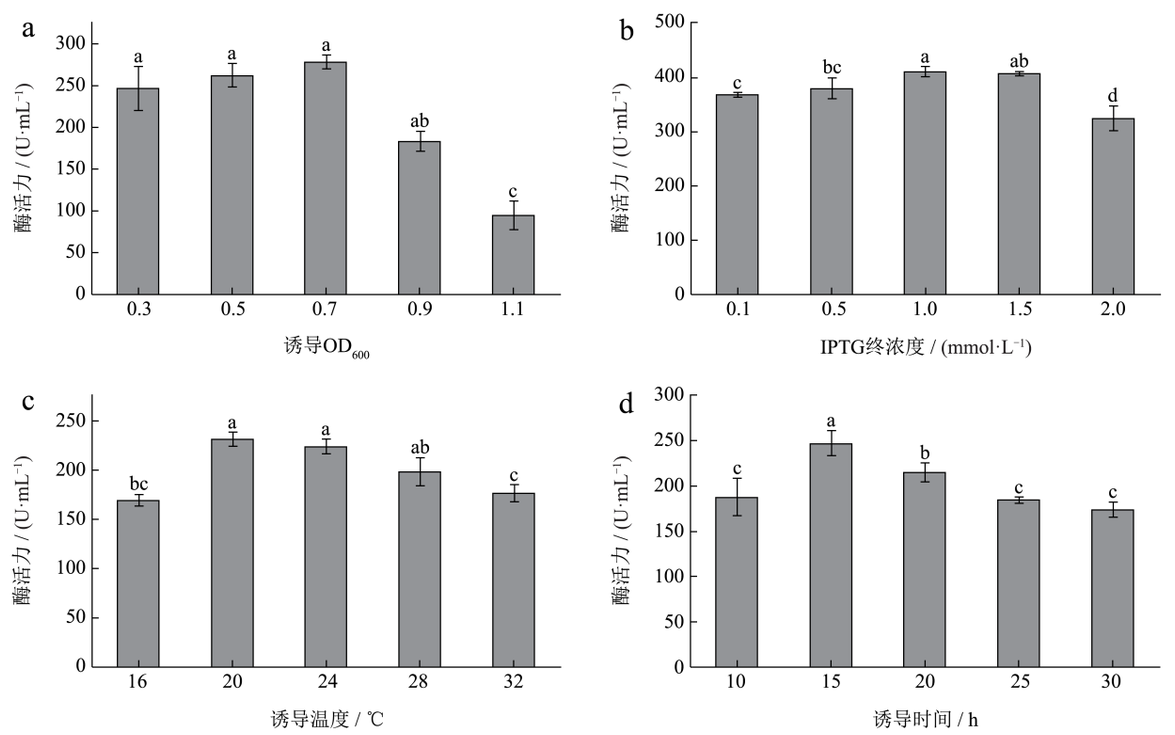


图 7 重组菌株 ES2 诱导培养条件优化

Fig.7 Optimization of induction conditions in cultivation of the recombinant strain ES2

表 5 亚精胺转化体系

Table 5 Spermine conversion system

成分	添加量
L-天冬氨酸	5 mmol·L^{-1}
腐胺	5 mmol·L^{-1}
ATP/NADH/NADPH/PLP	0.2 mmol·L^{-1}
粗酶 (以菌体湿重计)	25 g·L^{-1}
缓冲液	50 mmol·L^{-1} PBS（pH 值 7.5）

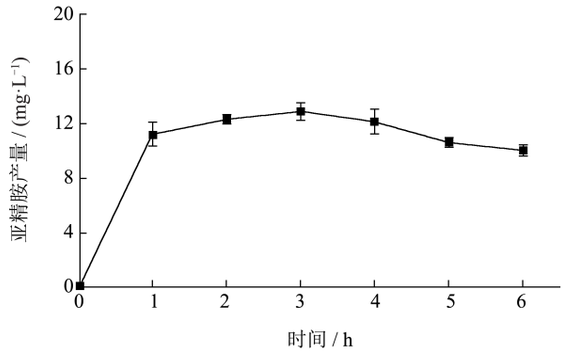


图 8 亚精胺生物合成曲线

Fig.8 Spermine biosynthesis curve

如图 8 所示，在 20 mL 反应体系下，在反应的起始阶段亚精胺迅速积累，经过 3 h 生物转化后，亚精胺的滴度达到 12.72 mg·L^{-1}，在此之后转化体系中的亚精胺含量保持相对稳定并逐渐降低。本研究初步证明了通过体外多酶级联的方式从天冬氨酸起始生产亚精胺的可行性。与前人研究相比，本研究以天冬氨酸为底物替代 S-腺苷甲硫氨酸或 L-高丝氨酸降低了原料成本。但 Kim 等[13]使用 S-腺苷甲硫氨酸途径生产亚精胺产量可以达到 224 mg·L^{-1}，与之相比产量相对较低。在多酶级联反应系统中，需要多种酶协同作用，由于不同酶之间酶学性质的差距，相同的反应条件会对酶产生不同的影响。不适宜的反应条件可能会造成中间产物的过量积累，或反应系统的中断，是影响最终产物产量的关键因素。为提高亚精胺产量下一步需对反应温度、pH 值、酶配比等反应条件进行优化。

2.6 讨论

亚精胺是一类广泛存在于生物体中的多胺。近年来，对于亚精胺的研究主要集中在延缓衰老[27]和改善心血管功能方面[28]。亚精胺作为一种新兴的保健品，越来越多的受到公众的关注，因此迫切需要开展更多研究以满足市场需求。现阶段生物合成手段主要包括传统发酵法和体外酶转化两种。与体外酶转化相比，传统发酵法在体内构建亚精胺合成途径生产亚精胺具有操作简单，生产周期短的优点。然而在体内构建亚精胺合成途径存在一个瓶颈，高浓度下的亚精胺及腐胺等多胺类物质具有细胞毒性，会破坏蛋白质、DNA 及其它细胞成分造成宿主细胞的活性下降甚至死亡[29]，因此通过体内途径合成亚精胺在工程菌的构建改造与发酵调控方面存在较高要求。而先通过微生物生产酶再于体外进行酶转化的方式不涉及宿主菌体内的多胺代谢调控，规避了高浓度亚精胺对宿主菌的损害，更易实现亚精胺的积累。同时，在多酶催化体系中不同酶的催化效率存在差异，通过体外酶转化的方式生产亚精胺可在转化过程中对不同酶的加酶量进行调整，以提高整体反应效率，从而改善中间产物的不足或过度积累。因此，本研究通过体外酶转化的方法构建了一种自天冬氨酸起始的多酶级联催化系统，用于亚精胺的生物合成，为后续构建体内亚精胺合成途径通过发酵法生产亚精胺提供理论基础。

自天冬氨酸起始经由 ASA 途径合成亚精胺的过程中需要四种酶的参与，作为宿主细胞的大肠杆菌中存在天冬氨酸激酶与天冬氨酸半醛脱氢酶的基因，可通过过表达大肠杆菌中相关基因的方式获取对应的酶。在大肠杆菌中存在三种不同的天冬氨酸激酶 AK Ⅰ、AK Ⅱ与 AK Ⅲ，分别受到不同氨基酸的反馈调控，其中 AK Ⅰ与 AK Ⅱ是双功能酶，具有天冬氨酸激酶与高丝氨酸脱氢酶的双重活性[30]。其高丝氨酸脱氢酶活性会导致天冬氨酸-*β*-半醛向高丝氨酸的方向转化，造成中间产物的损耗，因此选择 AK Ⅲ进行研究。而在大肠杆菌中不存在的羧基亚精胺脱氢酶与羧基亚精胺脱羧酶合成基因则需要外源导入。而在文献报道中来自 *Agrobacterium fabrum str. C58* 的 CASDH 和来自 *Campylobacter jejuni 81116* 的CASDC 拥有较高酶活性，因此选择这两个来源的酶进行下一步实验。

本研究探讨了 AK、ASADH、CASDH 和 CASDC 的体外级联反应，验证了这一多酶级联催化系统用于亚精胺生物合成的可行性和潜力。然而这一体外级联反应仍存在一些困难与挑战，如在多酶级联催化系统中存在多种酶的联合作用，反应条件对催化系统的反应效率存在重要影响，在今后的研究中应对反应条件进行探索，如反应温度、酶配比、辅因子浓度、底物浓度等。此外，昂贵的辅因子的加入，增加了体外多酶催化的成本。解决这些问题的有效方法之一是引入辅因子再生系统，通过在多酶级联催化系统中引入辅因子循环酶，仅需要投入较少的辅因子就能维持亚精胺合成反应的进行。与在系统中大量投入昂贵的辅因子相比，选择引入辅因子再生系统无疑是更为廉价更加经济的选择。从应用的角度考虑，通过发酵法生产亚精胺相较于体外酶转化，在生产周期与生产成本上

存在优势，在后续研究中将尝试对工程菌进行进一步改造，通过发酵法实现自天冬氨酸起始的亚精胺合成。

3 结论

本研究设计了一条四酶级联催化天冬氨酸和腐胺合成亚精胺的途径。在此基础上构建体外多酶级联催化系统成功合成了亚精胺，证明了通过体外多酶级联的方式以相对廉价的天冬氨酸为底物合成亚精胺具有可行性。

探究了天冬氨酸激酶与天冬氨酸-*β*-半醛脱氢酶的酶学性质并对酶的表达条件进行了优化。天冬氨酸激酶的最适温度 40 ℃、最适 pH 值 10.0、温度稳定性较高在 40 ℃时比较稳定、Zn^{2+} 对其有明显激活作用 Cu^{2+} 具有明显抑制作用，该酶表达的最佳诱导 OD_{600} 为 0.7、IPTG 浓度为 0.5 mmol·L^{-1}、诱导温度 16 ℃、诱导时间 20 h。天冬氨酸-*β*-半醛脱氢酶的最适温度 20 ℃、最适 pH 值 8.0、在 20 ℃时相对稳定、除 Fe^{3+} 外其它金属离子对其均有明显抑制作用，该酶表达的最佳诱导 OD_{600} 为 0.7、IPTG 浓度为 1.0 mmol·L^{-1}、诱导温度 20 ℃、诱导时间 15 h。研究在 0.44 g·L^{-1}（5 mmol·L^{-1}）腐胺和 0.665 g·L^{-1}（5 mmol·L^{-1}）天冬氨酸条件下经过 3 h 生物转化后，亚精胺的滴度达到 12.72 mg·L^{-1}。后续将对多酶级联催化系统的反应条件进行探索，如反应温度、酶配比、辅因子浓度、底物浓度等。同时针对系统中需要添加较多辅因子的问题，可尝试引入适宜的辅因子再生系统，进一步降低亚精胺的生产成本。

参考文献

[1] SHI Y J, ZHANG J, WANG Y W, et al. The untapped potential of spermidine alkaloids: sources, structures, bioactivities and syntheses [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 240: e114600.

[2] FAN J, FENG Z, CHEN N. Spermidine as a target for cancer therapy [J]. Pharmacological Research, 2020, 159: e104943.

[3] VAN L A. Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, de natis e semine genitali animalculis [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1679, 12(142): 1040-1046.

[4] DUDLEY H W, ROSENHEIM M C, ROSENHEIM O. The chemical constitution of spermine. I. The isolation of spermine from animal tissues, and the preparation of its salts [J]. Biochemical Journal, 1924, 18(6): 1263-1272.

[5] FAIRLEY L H, LEJRI I, GRIMM A, et al. Spermidine rescues bioenergetic and mitophagy deficits induced by disease-associated Tau protein [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): e5297.

[6] CARRICHE G M, ALMEIDA L, STÜVE P, et al. Regulating T-cell differentiation through the polyamine spermidine [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2021, 147(1): 335-348.

[7] SCHROEDER S, HOFER S J, ZIMMERMANN A, et al. Dietary spermidine improves cognitive function [J]. Cell Reports, 2021, 35(2): e108985.

[8] SUN J, XU J, LIU Y, et al. Exogenous spermidine alleviates diabetic cardiomyopathy via suppressing reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress, and Pannexin-1-mediated ferroptosis [J]. Biomolecules and Biomedicine, 2023, 23(5): 825-837.

[9] SHU J, XU J, LIU Y, et al. Spermidine inhibits M1 microglia polarization in a mouse model of Parkinson's disease and BV2 cells via NF-*κ*B/STAT-1 pathway [J]. Brain and Behavior, 2025, 15(3): e70410.

[10] PIETROCOLA F, POL J, VACCHELLI E, et al. Caloric restriction mimetics enhance anticancer immunosurveillance [J]. Cancer Cell, 2016, 30(1): 147-160.

[11] ZHU H, TIAN W, ZHU X, et al. Ectopic expression of GhSAMDC1 improved plant vegetative growth and early flowering through conversion of spermidine to spermine in tobacco [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): e14418.

[12] LI Y B, CHEN B X, KURTENBACH R. Spermidine and spermine converted from putrescine improve the resistance of wheat seedlings to osmotic stress [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2023, 70(3): e48.

[13] KIM S K, JO J H, PARK Y C, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of spermidine under optimal culture conditions [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2017, 101: 30-35.

[14] TAIT G H. A new pathway for the biosynthesis of spermidine [J]. Biochemical Society Transactions, 1976, 4(4): 610-612.

[15] XI H, NIE X, GAO F, et al. A bacterial spermidine biosynthetic pathway via carboxyaminopropylagmatine [J]. Science Advances, 2023, 9(43): e9075.

[16] ZOU D, LI L, MIN Y, et al. Biosynthesis of a novel bioactive metabolite of spermidine from *Bacillus amyloliquefaciens*: gene mining, sequence analysis, and combined expression [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(1): 267-274.

[17] KO K Y, PARK S C, CHO S Y, et al. Structural analysis of carboxyspermidine dehydrogenase from *Helicobacter pylori* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 635: 210-217.

[18] HANFREY C C, PEARSON B M, HAZELDINE S, et al. Alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in human gut microbiota [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(50): 43301-43312.

[19] LIU Y, GUO X, WANG X, et al. A two-enzyme cascade system for the bio-production of spermidine from putrescine [J]. Molecular Catalysis, 2021, 504: e111439.

[20] LIANG X, DENG H, BAI Y, et al. Characterization of a novel type homoserine dehydrogenase with high oxidation activity from *Arthrobacter nicotinovorans* [J]. Process Biochemistry, 2022, 114: 102-110.

[21] LIANG X, DENG H, BAI Y, et al. Highly efficient biosynthesis of

spermidine from L-homoserine and putrescine using an engineered *Escherichia coli* with NADPH self-sufficient system [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2022, 106(17): 5479-5493.

[22] WAMPLER D E, WESTHEAD E W. Two aspartokinases from *Escherichia coli* nature of the inhibition and molecular changes accompanying reversible inactivation [J]. Biochemistry, 1968, 7(5): 1661-1671.

[23] BLACK S. [111a] Conversion of aspartic acid to homoserine: ATP+L-aspartate ⇄ ADP+*β*-L-aspartyl phosphate (1) TPNH + *β*-L-aspartyl phosphate ⇄ TPN+P+l-aspartic-*β*-semialdehyde (2) DPNH+L-aspartic-*β*-semialdehyde ⇄ DPN+L-homoserine (3) [M]. Methods in Enzymology. Academic Press, 1962, 5: 820-827.

[24] LIANG X, DENG H, XIONG T, et al. Overexpression and biochemical characterization of a carboxyspermidine dehydrogenase from *Agrobacterium fabrum str. C58* and its application to carboxyspermidine production [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(9): 3858-3868.

[25] FREILICH R, ARHAR T, ABRAMS J L, et al. Protein-protein interactions in the molecular chaperone network [J]. Accounts of Chemical Research, 2018, 51(4): 940-949.

[26] PENG S, CHU Z, LU J, et al. Co-expression of chaperones from *P. furiosus* enhanced the soluble expression of the recombinant hyperthermophilic *α*-amylase in *E. coli* [J]. Cell Stress and Chaperones, 2016, 21(3): 477-484.

[27] CHAMOTO K, ZHANG B, TAJIMA M, et al. Spermidine-an old molecule with a new age-defying immune function [J]. Trends in Cell Biology, 2024, 34(5): 363-370.

[28] SONG N, JI E, YU J E, et al. Spermidine enhances mitochondrial function and mitigates aortic valve calcification : Implications for DNA Methyltransferase-1 activity [J]. Journal of the American College of Cardiology: Basic Trans Science, 2025, 10(3): 345-366.

[29] SAKAMOTO A, SAHARA J, KAWAI G, et al. Cytotoxic mechanism of excess polyamines functions through translational repression of specific proteins encoded by polyamine modulon [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): e2406.

[30] JIN X, WANG S, WANG Y, et al. Metabolic engineering strategies for L-Homoserine production in *Escherichia coli* [J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): e338.