

通过提高胞内辅酶水平促进 L-苯甘氨酸的合成

刘巧利, 杨套伟, 周俊平, 徐美娟, 张显, 饶志明*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: NAD(H)是全细胞转化合成 L-苯甘氨酸中必需的辅酶,其在胞内的质量摩尔浓度对 L-苯甘氨酸的合成至关重要。作者通过共表达烟酸转磷酸核糖激酶和 NAD⁺合酶的编码基因 *pncB* 和 *nadE*,以期提高胞内辅酶水平,从而提高全细胞转化效率。结果表明,*pncB* 和 *nadE* 的共表达使胞内 NAD(H)含量提高了 2.35 倍,同时添加 20 mg/L 的烟酸使胞内 NAD⁺含量进一步提高了 2.42 倍,最终,全细胞催化活性和转化产量分别提高了 94%和 36.6%,说明在辅酶依赖型全细胞转化中,胞内辅酶水平的提高可以有效提高转化效率。

关键词: L-苯甘氨酸;全细胞转化;烟酸转磷酸核糖基酶;NAD⁺合酶;烟酸;胞内辅酶水平

中图分类号:Q 819.4 文章编号:1673-1689(2019)03-0046-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.007

Improve the Synthesis of L-Phenylglycine by Increasing the Intracellular Coenzyme Level

LIU Qiaoli, YANG Taowei, ZHOU Junping, XU Meijuan, ZHANG Xian, RAO Zhiming*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Coenzyme NAD (H) is necessary for whole cell synthesis of L-phenylglycine, so intracellular NAD (H) level is critical for L-phenylglycine synthesis. In this study, the co-expression of the genes *pncB* and *nadE* encoding of nicotinic acid phosphoribosyltransferase and NAD⁺ synthase separately was conducted to increase intracellular NAD (H) level so as to accelerate the whole-cell transformation. The results showed that the NAD (H) level in whole cell was increased by 2.35-fold when *pncB* and *nadE* were co-expressed, and it was further increased by 2.42-fold with the addition of 20 mg/L nicotinic acid (NA). Significantly, the whole cell catalytic activity and L-phenylglycine yield were increased by 94% and 36.6%, respectively, indicating that the transformation efficiency can be effectively improved by the increase of intracellular coenzyme levels in the coenzyme-dependent whole cell transformation systems.

Keywords: L-phenylglycine, whole cell transformation, nicotinic acid phosphoribosyltransferase, NAD⁺ synthase, nicotinic acid, intracellular coenzyme level

收稿日期: 2017-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21778024); 中国博士后科学基金项目 (2017M620189); 江苏省杰出青年科学基金项目 (BK20150002); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助项目 (LITE2018-06); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (JUSRP51708A); 江苏高校优势学科建设工程资助项目资助。

* 通信作者: 饶志明 (1975—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事应用微生物与代谢工程研究。E-mail: raozm@jiangnan.edu.cn

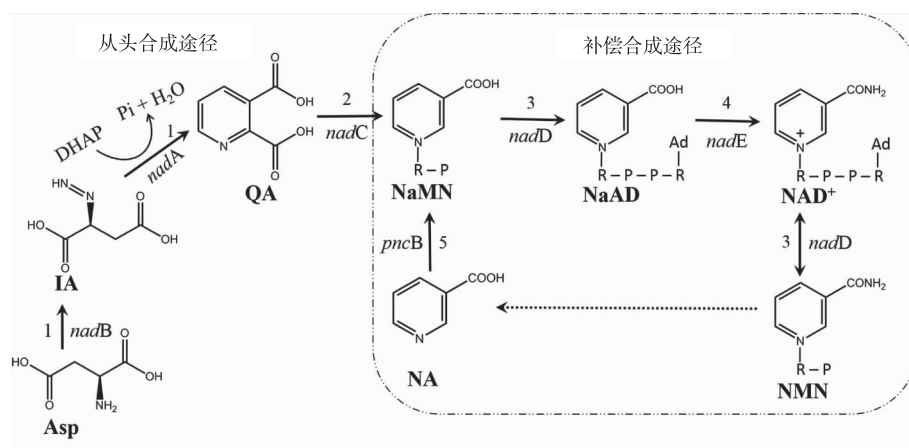
引用本文: 刘巧利, 杨套伟, 周俊平, 等. 通过提高胞内辅酶水平促进 L-苯甘氨酸的合成[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(03): 46-53.

L-苯甘氨酸是一种手性芳香族非天然氨基酸,是合成多种 β -内酰胺类抗生素及抗癌药物紫杉醇的重要前体物质^[1-4],在医药产业中具有广泛的应用价值。目前主要通过化学方法合成^[5],但是化学合成法反应条件剧烈、工艺复杂、副产物较多、产品光学纯度不够,且反应中需用到大量有机试剂和剧毒物质,严重污染环境。通过生物催化法合成L-苯甘氨酸,不仅反应条件温和、绿色环保,而且由于酶的底物特异性和立体选择性,副产物较少,产品可以达到光学纯度,易于分离,可直接用于药物的合成^[6]。因此,建立高效的生物催化方法在L-苯甘氨酸的工业生产中具有重要的研究意义。

在之前的研究中,通过在大肠杆菌 *E.coli* BL21 (DE3)中共表达来源于蜡样芽孢杆菌的亮氨酸脱氢酶(LeuDH)和来源与博依丁假丝酵母的甲酸脱氢酶(FDH)构建胞内辅酶再生体系,利用重组菌 *E.coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh* 作为催化剂,实现了从苯乙酮酸到L-苯甘氨酸的全细胞转化合成^[7]。在类似的全细胞转化体系中,添加胞外辅酶(NAD^+)可以有效地提高转化速率^[8-9],说明在脱氢酶过表达的情况下,胞内环境存在辅酶供应不足的问题,因此提高胞内辅酶(NAD(H))水平是进一步提高反应速率的有效策略之一。

大肠杆菌中 NAD(H) 合成途径分为从头合成

途径和补救合成途径,见图1。其中烟酸转磷酸核糖基酶(NAPRTase)是补救合成途径的限速酶^[10]。通过加强表达 NAD(H) 合成途径中的关键酶和培养基中添加合成前体物质可有效提高胞内 NAD(H) 的含量^[11]。Berrios-Rivera 等^[12]在大肠杆菌中表达鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 来源的 NAPRTase 基因(*pncB*)使胞内 NAD^+ 、 NADH 和总 NAD(H) 分别提高了 81.8%、29.8% 和 41.7%,证明 NAPRTase 的过表达可有效促进胞内 NAD(H) 的合成。Witholts 等^[13]在大肠中过表达自身来源的 NAPRTase 时,胞内 NAD(H) 总量提高了 5 倍。Heuser F 等^[14]在 *E.coli* 中分别过表达 NAPRTase 和 NAD^+ 合酶时(NAD^+ Syn),胞内 NAD(H) 的总量分别提高了两倍,当同时过表达这两个关键酶基因 *pncB* 和 *nadE* 时,菌株胞内 NAD(H) 总量提高了 7 倍,有效提高了全细胞催化合成(R)-甲基-3-羟基丁胺的反应速率,说明和 NAPRTase 一样, NAD^+ Syn 也是 NAD(H) 补救合成途径的限速酶。张鑫等^[15]通过在 *E.coli* 中过表达 *pncB* 和 *nadE*,使全细胞转化合成 1,4-丁二醇的转化率提高了 13.03%,产物得率提高了 40.9%。另外,穆晓清等^[16]通过在大肠杆菌中共表达 *pncB* 和 *nadE*,在培养基中添加前体物质烟酸(NA)有效地促进了胞内 NAD^+ 的合成。



1: 喹啉酸合酶;2: 喹啉酸转磷酸核糖基酶;3: 烟酸单酸腺苷转移酶;4: NAD^+ 合酶;5: 烟酸转磷酸核糖基酶;Asp: 天冬氨酸;IA: 亚硝基天冬氨酸;QA: 喹啉酸;NaMN: 烟酸单酸;NaAD: 烟酸腺嘌呤二核苷酸; NAD^+ : 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸;NMN: 烟酸单核苷酸;NA: 烟酸。

图1 大肠杆菌中辅酶 NAD^+ 的从头合成途径及和补救合成途径

Fig. 1 De novo synthesis pathway and salvage synthesis pathway of coenzyme NAD^+ in *E. coli*

基于以上的研究,作者拟在实验室前期构建保藏的 L-苯甘氨酸催化合成菌株 *E.coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh* 中共表达 NAPRTase 和 NAD⁺ Syn 的编码基因 *pncB* 和 *nadE*, 并在发酵培养基中添加 NA,以期提高重组大肠杆菌胞内 NAD(H)的质量摩尔浓度,进而提高全细胞转化苯乙酮酸合成 L-苯甘

酸的转化效率。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株与质粒见表 1。

表 1 本研究所用的菌株、质粒和引物
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this work

菌株、质粒及引物	特征及序列	来源及备注
菌株		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal λ(DE3)</i>	作者所在实验室储存
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA 1, endA 1, gyrA 96, thi-1, hsdR 17(rK-mK-) supE44</i>	作者所在实验室储存
质粒		
pACYCDuet-1	Cm ^R	作者所在实验室储存
pACYCDuet- <i>pncB</i>	Cm ^R , expression NAPRTase in <i>E. coli</i>	本研究构建
pACYCDuet- <i>nadE</i>	Cm ^R , expression NAD ⁺ Syn in <i>E. coli</i>	本研究构建
pACYCDuet- <i>pncB-nadE</i>	Cm ^R , expression NAPRTase and NAD ⁺ Syn in <i>E. coli</i>	本研究构建
pETDuet- <i>ldh-fdh</i>	Amp ^R expression LeuDH and FDH in <i>E. coli</i>	作者所在实验室储存
引物		酶切位点
P1	CGGGATCCAATGACACAATTCGCTTCTCC	<i>Bam</i> H I
P2	CGGAATTCCTTAAGTGGCTTTTAAATATGC	<i>Eco</i> R I
P3	GAAGATCTAATGACATTGCAACAACAAAT	<i>Bgl</i> II
P4	CCGCTCGAGTTACTTTTCCAGAAATCAT	<i>Xho</i> I

Cm^R:氯霉素抗性;酶切位点用下划线标注。

1.2 主要试剂与仪器

DL-苯甘氨酸标准品 (纯度 > 98.5%,D 型和 L 型的比例为 1:1)、苯乙酮酸标准品 (纯度 > 98.5%) 以及 NAD⁺、NADH: 均购自 Sigma Aldrich 公司;分子生物学工具酶、DNA Markers: 均购自 TaKaRa 公司;基因组提取试剂盒、DNA 回收试剂及质粒提取试剂盒:均购自上海捷瑞生物工程有限公司;辅酶 I NAD(H)含量测定试剂盒:购自索莱宝公司;引物合成与核酸序列测定:由上海金唯智生物工程公司完成;其他试剂均购自国药集团。PCR 仪:购自 Bio-Rad 公司;UVP 凝胶成像仪:购自英国 UVP 有限公司;高速冷冻离心机:购自 HITACHI 公司;超声破碎仪: 购自 SONICS 公司;高效液相色谱仪: 购自 Agilent 公司;色谱柱:C18、C8 及有机酸柱均购自 DIMARK 公司。

1.3 重组质粒的构建

根据 NCBI 中公布的 *E.coli* BL21 (DE3)来源的 NAPRTase 基因 *pncB*(GenBank 登录号:8113566)和

NAD⁺ Syn 基因 *nadE*(GenBank 登录号:8179982)序列设计引物,以 *E.coli* BL21 (DE3)基因组为模板,进行 PCR 扩增,PCR 产物 *pncB* 和 *nadE* 经过试剂盒纯化后,分别连接至克隆载体pMD18-T,转化 *E.coli* JM109,通过氨苄青霉素(Amp)平板筛选阳性转化子,提质粒酶切验证,并进行测序鉴定。目的基因分别与表达载体 pACYCDuet-1 连接,构建重组质粒 pACYCDuet-*pncB* 和 pACYCDuet-*nadE*,转化 *E.coli* BL21 (DE3)得到重组菌 *E.coli* BL21/pACYCDuet-*pncB* 和 *E.coli* BL21/pACYCDuet-*nadE*,通过氯霉素(Cm)平板筛选阳性转化子。两基因依次连接载体可得重组质粒 pACYCDuet- *pncB-nadE*, 转化重组菌 *E.coli* BL21/pETDuet- *leudh-fdh*, 通过 Amp/Cm 双抗平板筛选阳性转化子,验证正确即得到双质粒共表达重组菌 *E.coli* BL21/pETDuet -*ldh -fdh*&pACYCDuet-*pncB -nadE*。

1.4 重组菌的培养及诱导

LB 种子培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,

NaCl 10 g/L, pH 7.0。

发酵培养基:蛋白胨 12 g/L, 酵母粉 24 g/L, 甘油 5 g/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L。

各重组菌按照 1% 的接种体积分数转接入 10 mL 含相应抗性的种子培养基, 37 °C、180 r/min 下培养 10 h。种子液再按照 1% 的接种体积分数接入发酵培养基, 37 °C 下培养, 至菌体 OD_{600} 为 0.3~0.5, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.5 mmol/L, 24 °C、160 r/min 诱导 12 h。

发酵培养基中 NA 的添加: NA 用蒸馏水配成 5 g/L 的添加液, 通过过滤除菌, 并低温冷冻保藏, 在 IPTG 诱导培养时加入发酵培养基。

1.5 酶活测定

4 °C 下离心发酵菌液 (8 000 r/min 离心 5 min), 并用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤细胞两次后, 按照 10 倍浓缩的比例用缓冲液重新悬浮菌体, 低温下对菌体进行超声破碎, 12 000 r/min 离心 20 min, 得到破碎上清粗酶液, 用于 SDS-PAGE 分析及酶活测定。LeuDH 和 FDH 酶活测定分别参考 Ansorge^[17] 和 Zheng 等^[18] 的报道, NAPRTase 和 NAD^+ Syn 的酶活测定参考 Heuser F 等^[14] 的报道。蛋白质质量浓度检测采用 Bradford 法^[19], 以牛血清蛋白 BSA 为标准品。

1.6 胞内 NAD(H) 质量摩尔浓度测定

发酵培养基培养各 *E. coli* 菌株至对数中后期, 取培养液用于测定胞内 NAD^+ 和 NADH 质量摩尔浓度。分别用酸性和碱性提取液提取样品中 NAD^+ 和 NADH , NADH 通过 PMS 的递氢作用, 还原氧化型噻唑蓝 (MTT) 为甲瓖, 在 570 nm 下检测吸光值; 而 NAD^+ 可被乙醇脱氢酶还原为 NADH , 进一步采用 MTT 还原法检测。

具体操作步骤参考试剂盒说明书及相关参考文献[20-21]。

1.7 细胞浓度及全细胞催化活性的测定

取 1 mL 菌液用蒸馏水适当稀释, 用紫外分光光度计测稀释菌液 600 nm 下的吸光度 (OD_{600}), 细胞干重 (DCW) 可通过以下公式计算^[22]:

$$\text{DCW (g/L)} = 0.444 \times \text{OD}_{600} - 0.021$$

在全细胞转化中, 细胞催化活性定义为反应开始时每克干细胞每分钟催化合成 L-苯甘氨酸的量。在全细胞转化反应持续 30 min 时取样, 4 °C、10 000 r/min 下离心 5 min 以终止反应, 上清液经稀

释通过 HPLC 检测 L-苯甘氨酸的产量, 用于计算细胞催化活性。

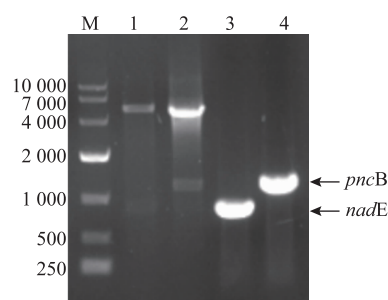
1.8 全细胞法催化合成 L-苯甘氨酸

底物苯乙酮酸 30 g/L 溶于 0.1 mol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液, 滴加 50% 的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 使其溶解, 同时加入 2.4 g 甲酸铵及体积分数 5% 的甘油, 最后加入全细胞催化剂 5 g/L (DCW), 转化体系为 20 mL, 置于磁力搅拌器上进行转化, 控制温度为 30 °C, pH 8.0, 转速 160 r/min, 反应过程中通过滴加 50% 的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 或 20% 的甲酸来调节反应体系的 pH。L-苯甘氨酸的产量及 ee 值通过 HPLC 检测, 具体方法参考 Cheng 等^[23] 的检测方法。

2 结果与讨论

2.1 NAPRTase 和 NAD^+ 合酶基因的克隆及共表达

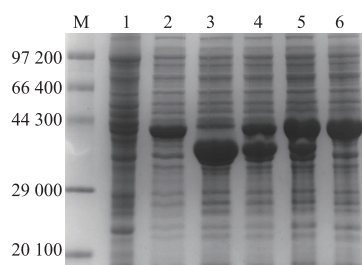
以大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 基因组为模板, 分别利用引物对 P1/P2 和 P3/P4 进行 PCR 扩增, PCR 产物分别为 1 203 bp 和 828 bp, 经测序鉴定与 NCBI 数据库报道 *pncB* 和 *nadE* 序列一致, 通过限制性酶切法将目的基因与表达载体 pACYCDuet-1 连接, 构建重组表达载体, 酶切及 PCR 验证结果见图 2, 证明 NAPRTase 和 NAD^+ Syn 的重组共表达载体 pACYCDuet-*pncB*-*nadE* 构建成功。将经过诱导培养的各重组菌及原始菌分别超声破碎并离心后, 取上清液进行 SDS-PAGE 分析及酶活测定。SDS-PAGE 分析结果见图 3。



M: DNA marker; 1: pACYCDuet-*pncB*-*nadE* 双酶切 (*Bam*HI / *Eco*RI); 2: pACYCDuet-*pncB*-*nadE* 双酶切 (*Bgl*II / *Xho*I); 3: *pncB* PCR 验证; 4: *nadE* PCR 验证

图 2 重组载体 pACYCDuet-*pncB*-*nadE* 酶切及 PCR 验证

Fig. 2 Restriction and PCR validation of recombinant vector pACYCDuet-*pncB*-*nadE*



M: 蛋白质 marker; 1: *E. coli* BL21/pETDuet-1; 2: *E. coli* BL21/pETDuet-*pncB*; 3: *E. coli* BL21/pETDuet-*nadE*; 4: *E. coli* BL21/pETDuet-*pncB* - *nadE*; 5: *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh* - *fdh* & *pACYCDuet-pncB-nadE*; 6: *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh* - *fdh*

图3 各重组菌的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant strains

在单表达及单质粒共表达时 NAPRTase 和 NAD⁺ Syn 分别在 44 100 和 30 400 处有明显的表达条带, 在双质粒共表达时, LeuDH、FDH 和 NAPRTase 的相对分子质量差异较小, 均位于为 40 000 附近, 因此在共表达 SDS-PAGE 分析时三者无法区分, NAD⁺ Syn 有明显的表达条带, 说明通过该双质粒表达系统成功实现了 LeuDH、FDH、NAPRTase 和 NAD⁺ Syn 在 *E. coli* 中的共表达。分别

表2 不同菌株的酶活

Table 2 Enzyme activities in different strains

菌株	LeuDH 酶活/(U/mg)	FDH 酶活/(U/mg)	NAPRTase 酶活/(U/mg)	NAD ⁺ Syn 酶活/(U/mg)
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet-1	0.06 ± 0.01	—	0.15 ± 0.06	0.03 ± 0.008
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>ldh</i> - <i>fdh</i>	18.78 ± 0.14	0.34 ± 0.08	0.12 ± 0.04	0.04 ± 0.005
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet- <i>pncB</i>	0.05 ± 0.009	—	2.12 ± 0.38	0.06 ± 0.009
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet- <i>nadE</i>	0.08 ± 0.005	—	0.17 ± 0.08	1.24 ± 0.005
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet- <i>pncB</i> - <i>nadE</i>	0.09 ± 0.011	—	1.72 ± 0.27	0.86 ± 0.021
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>ldh</i> - <i>fdh</i> & <i>pACYCDuet-pncB-nadE</i>	15.34 ± 0.21	0.28 ± 0.05	0.97 ± 0.14	0.36 ± 0.006

2.2 NAPRTase 和 NAD 合酶的表达对菌体生长及胞内辅酶的影响

各重组菌株经 37 °C 活化后, 于 24 °C 下诱导培养 12 h, 首先通过紫外分光光度计测其细胞浓度 (OD₆₀₀), 并计算细胞干重, 之后收集菌体检测胞内 NAD(H) 质量摩尔浓度, 结果见表 3。基因 *pncB* 和 *nadE* 在大肠杆菌中的过表达分别使提高胞内 NAD(H) 质量摩尔浓度提高了 86.3% 和 59.3%, 当两者共表达时则提高了 2.92 倍, 双质粒重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh*-*fdh*&*pACYCDuet-pncB-nadE* 胞内 NAD(H) 质量摩尔浓度较重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh*-*fdh* 提高了 2.35 倍, 但是 NADH/NAD⁺ 的值在各重组菌中波动不大, 说明 *pncB* 和 *nadE* 的

测各重组菌粗酶液酶活, 以原始菌表达空载 pETDuet-1 作为对照, 结果见表 2。重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh*-*fdh* LeuDH 酶活为 18.78 U/mg, 是对照的 300 多倍, FDH 酶活为 0.34 U/mg, 对照组未检测到 FDH 酶活; 重组菌 *E. coli* BL21/pACYCDuet-*pncB* NAPRTase 酶活为 2.12 U/mg, 是对照的 14 倍, 重组菌 *E. coli* BL21/pACYCDuet-*nadE* NAD⁺ Syn 酶活为 1.24 U/mg, 是对照的 41 倍, 说明 NAPRTase 和 NAD⁺ Syn 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功过表达。对重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh*-*fdh*&*pACYCDuet-pncB-nadE* 的酶活分析发现, LeuDH 和 FDH 的酶活与单质粒菌株 *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh*-*fdh* 的酶活差异不明显, 而 NAPRTase 及 NAD⁺ Syn 的酶活却明显低于重组菌 *E. coli* BL21/pACYCDuet-*nadE*, 但高于对照组, 酶活结果与蛋白质表达情况一致, 说明该双质粒表达体系中各酶均可以有效表达, 且重组质粒 *pACYCDuet-pncB-nadE* 的表达对参与转化的 LeuDH 和 FDH 的表达影响不大, 可能的原因是 pET 质粒的 ColE1 复制子强度大于 *pACYC* 质粒的 *p15A* 复制子^[24]。

过量表达均可促进胞内 NAD⁺ 的合成, 使得胞内 NAD(H) 质量摩尔浓度显著提高, 并不会造成胞内氧化还原态失衡, 且两者对 NAD⁺ 合成的促进作用具有累加效应。另外, *pncB* 和 *nadE* 过表达的重组菌生物量均不同程度地高于对照菌株, 说明胞内 NAD(H) 质量摩尔浓度的提高对细胞生长具有一定的促进作用, 可能是因为胞内 NADH 质量摩尔浓度的提高增加了细胞生长的能量供给。

2.3 烟酸质量浓度对菌体生长及胞内辅酶的影响

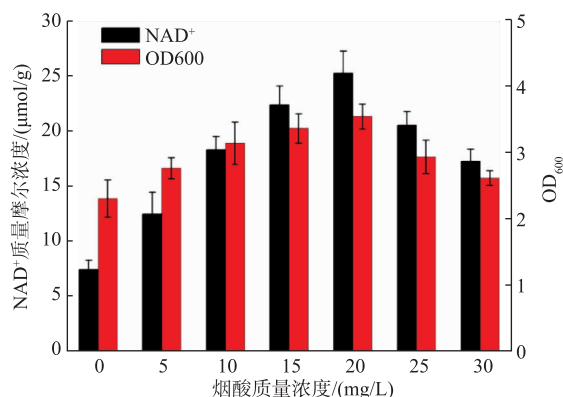
为了进一步提高胞内辅酶水平, 在发酵培养基中添加不同质量摩尔浓度的 NAD⁺ 补救合成途径前体物质 NA, 分别测定重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh*-*fdh*& *pACYCDuet-pncB-nadE* 细胞浓度与胞内

表3 各重组菌的生长情况及胞内NAD(H)含量测定

Table 3 Growth and intracellular NAD(H) concentration of different recombinant strains

菌株	生物量(DCW)/(g/L)	NAD ⁺ 质量摩尔浓度/ ($\mu\text{mol/g}$)	NADH 质量摩尔浓度/ ($\mu\text{mol/g}$)	NADH/NAD ⁺
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet-1	2.14 $\pm$ 0.18	2.67 $\pm$ 0.23	0.18 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.011
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>ldh-fdh</i>	1.95 $\pm$ 0.22	2.34 $\pm$ 0.31	0.12 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.009
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet- <i>pncB</i>	2.42 $\pm$ 0.34	4.78 $\pm$ 0.56	0.53 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.014
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet- <i>nadE</i>	2.31 $\pm$ 0.41	4.16 $\pm$ 0.39	0.38 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.01
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet- <i>pncB-nadE</i>	2.36 $\pm$ 0.41	10.14 $\pm$ 0.95	1.02 $\pm$ 0.29	0.10 $\pm$ 0.022
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>ldh-fdh</i> &pACYCDuet- <i>pncB-nadE</i>	2.26 $\pm$ 0.17	7.37 $\pm$ 0.71	0.87 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.015

NAD⁺质量摩尔浓度,结果见图4。当NA质量浓度 ≤ 20 mg/L时,胞内NAD⁺质量摩尔浓度随NA质量浓度的增加而提高,当NA质量浓度为20 mg/L,胞内NAD⁺质量摩尔浓度最高为25.2 $\mu\text{mol/g}$ DCW,比不添加NA时提高了2.42倍,当NA质量浓度继续增加时,NAD⁺质量摩尔浓度则逐渐下降,说明过量的NA不利于NAD⁺的合成。同时考察了NA质量浓度对菌体生长的影响,当NA质量浓度 <20 mg/L时,菌体量随NA质量浓度的增加而增加,可能与胞内NAD⁺质量摩尔浓度的增加相关,但是当NA质量浓度进一步增加时,菌体生长明显受到抑制,说明过量的NA不利于菌体的生长和胞内辅酶水平的提高,因此发酵培养基中NA的最佳添加质量浓度为20 mg/L。同时发现NA的添加对重组菌*E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh*胞内NAD⁺质量摩尔浓度没有显著的提高作用,说明胞内辅酶水平的提高是胞外NA的添加和胞内*pncB*、*nadE*过表达共同作用的结果。

图4 烟酸质量浓度对菌体生长及胞内NAD⁺摩尔浓度的影响Fig 4 Effect of NA concentration on growth and intracellular NAD⁺ concentration

2.4 胞内辅酶水平对全细胞转化的影响

将重组菌*E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh*和*E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh*&pACYCDuet-*pncB-nadE*分别活化,并分别转接于添加20 mg/L的NA和不添加NA的发酵培养基中进行诱导,4℃离心,收集菌体用于L-苯甘氨酸的转化合成,分别检测不同菌株于不同培养基条件下的细胞催化活性,结果见图5(a)。在发酵培养基中未添加NA时,重组菌*E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh*&pACYCDuet-*pncB-nadE*的细胞催化活性比菌株*E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh*提高了56.5%,而当发酵培养中添加20 mg/L NA时,前者的细胞催化活性进一步提高了34.2%,而后者则提高不明显,这与*pncB*和*nadE*的过表达及发酵培养基中NA的添加对胞内辅酶水平的调节作用一致,说明胞内*pncB*和*nadE*的过表达及胞外NA的添加共同通过提高胞内辅酶水平来提高细胞催化活性。分别以不添加NA诱导的菌株*E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh*和添加NA诱导的菌株*E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh*&pACYCDuet-*pncB-nadE*为全细胞催化剂,在底物质量浓度为30 g/L,细胞质量浓度为5 g/L(DCW)的条件下,进行L-苯甘氨酸的转化反应,结果见图5(b)。与单质粒表达菌株相比,双质粒菌株全细胞转化苯乙酮酸的转化率提高了36.6%,L-苯甘氨酸的产量从16.7 g/L提高至23.9 g/L,说明胞内辅酶水平的提高可以显著提高全细胞催化活性,最终提高全细胞转化效率和L-苯甘氨酸的产量。

3 结语

在重组大肠杆菌中过表达NAPRTase和NAD⁺Syn的编码基因*pncB*和*nadE*,不仅可以有效地促进胞内NAD⁺的合成,提高胞内辅酶水平,并对菌体

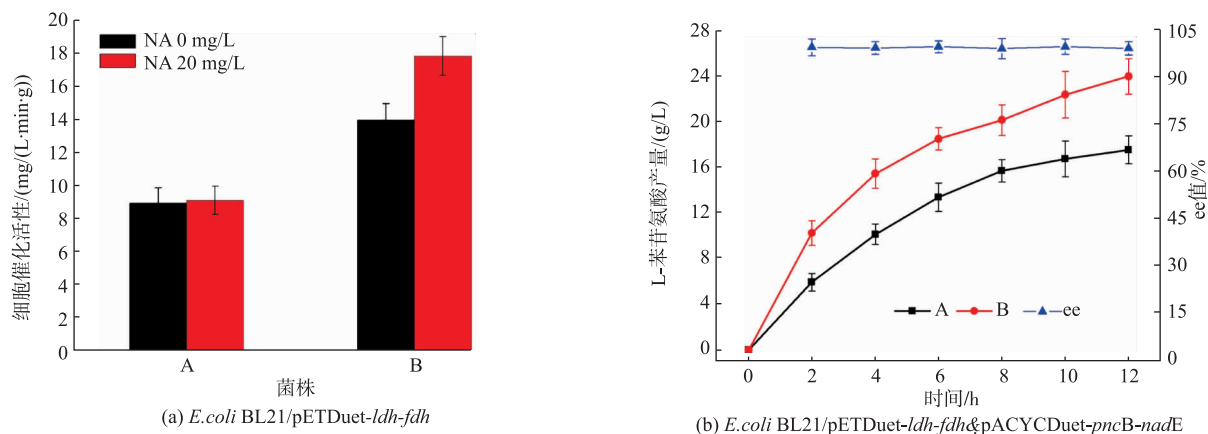


图 5 胞内辅酶水平提高对全细胞转化的影响

Fig. 5 Effect of intracellular cofactor level on the whole cell biotransformation

生长具有一定的促进作用,且两者对 NAD^+ 合成的促进作用具有累加效应。发酵培养基中添加 20 mg/L 的 NAD^+ 补救合成途径前体物质 NA 使得胞内辅酶水平进一步提高,最终将重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh*&pACYCDuet-*pncB-nadE* 用于全

细胞转化合成 L-苯甘氨酸,其细胞催化活性和转化率分别比重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*ldh-fdh* 提高了 94% 和 36.6%,说明在辅酶依赖型的全细胞转化体系中,胞内辅酶水平的提高可以有效地提高转化效率。

参考文献:

- [1] van LANGEN L M, van RANTWIJK F, SVEDAS V K, et al. Penicillin acylase-catalyzed peptide synthesis: a chemo-enzymatic route to stereoisomers of 3,6-diphenylpiperazine-2,5-dione[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, 11(5): 1077-1083.
- [2] NINGSIH F, KITANI S, FUKUSHIMA E, et al. VisG is essential for biosynthesis of virginiamycin S, a streptogramin type B antibiotic, as a provider of the nonproteinogenic amino acid phenylglycine[J]. *Microbiology*, 2011, 157(11): 3213-3220.
- [3] AL TOMA R S, BRIEKE C, CRYLE M J, et al. Structural aspects of phenylglycines, their biosynthesis and occurrence in peptide natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2015, 32(8): 1207-1235.
- [4] CROTEAU R, KETCHUM R E B, LONG R M, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2006, 5(1): 75-97.
- [5] ZHAO L. Study on new technology of phenylglycine synthesis [J]. *Chemical Engineering & Equipment*, 2013 (9): 48-51. (in Chinese)
- [6] HUBBARD B K, THOMAS M G, WALSH C T. Biosynthesis of L-p-hydroxyphenylglycine, a non-proteinogenic amino acid constituent of peptide antibiotics[J]. *Chemistry & Biology*, 2000, 7(12): 931-942.
- [7] LIU Q L, ZHOU J P, YANG T W, et al. Efficient biosynthesis of L-phenylglycine by an engineered *Escherichia coli* with a tunable multi-enzyme-coordinate expression system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(5): 2129-2141.
- [8] LIU W M, MA H M, LUO J X, et al. Efficient synthesis of L-tert-leucine through reductive amination using leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase coexpressed in recombinant *E. coli*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 91: 204-209.
- [9] RICHTER N, NEUMANN M, LIESE A, et al. Characterization of a whole-cell catalyst co-expressing glycerol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and its application in the synthesis of L-glyceraldehyde[J]. *Biotechnology & Bioengineering*,

- 2010,106(4):541-552.
- [10] IMSANDE J, PARDEE A B. Regulation of pyridine nucleotide biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1962, 237(4):134-137.
- [11] WANG Y, SAN K Y, BENNETT G N. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2013, 24(6):994-999.
- [12] BERRIOS-RIVERA S J, SAN K Y, BENNETT G N. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of NAD⁺, the NADH/NAD⁺ ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli* [J]. **Metabolic Engineering**, 2002, 4(3):238-247.
- [13] WUBBOLTS M G, TERPSTRA P, van BEILEN J B, et al. Variation of cofactor levels in *Escherichia coli*. sequence analysis and expression of the *pncB* gene encoding nicotinic acid phosphoribosyltransferase [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1990, 265(29):17665-17672.
- [14] HEUSER F, SCHROER K, LUTZ S, et al. Enhancement of the NAD (P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation [J]. **Engineering in Life Sciences**, 2010, 7(4):343-353.
- [15] ZHANG X, CHEN G Q. Enzymes related with NAD synthesis promote conversion of 1,4-butanediol to 4-hydroxybutyrate [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2011, 27(12):1749-1754. (in Chinese)
- [16] SHI H, MU X Q, YANG X L, et al. Cloning and expression of key enzymes for NAD⁺ synthesis and optimization of fermentation in *Escherichia coli* [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2017, 57(7):1112-1125. (in Chinese)
- [17] ANSORGE M B, KULA M R. Production of recombinant L-leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus* in pilot scale using the runaway replication system *E. coli*[pIET98] [J]. **Biotechnology & Bioengineering**, 2015, 68(5):557-562.
- [18] ZHENG J X, YANG T W, ZHOU J P, et al. Elimination of a free cysteine by creation of a disulfide bond increases the activity and stability of *Candida boidinii* formate dehydrogenase [J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 2017, 83(2):1-12.
- [19] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(s1-2):248-254.
- [20] LI J, CHEN K Q, HUANG X M, et al. Establishment of the determination of NAD⁺ and NADH in the anaerobic fermentation of organic acids [J]. **Food Science and Technology**, 2008, 33(12):254-257.
- [21] AL-ABADY Z N, DURANTE B, JOHN M A, et al. Large changes in NAD levels associated with CD38 expression during HL-60 cell differentiation [J]. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, 2013, 442(1-2):51-55.
- [22] SONG Y, LI J, SHIN H D, et al. One-step biosynthesis of α -ketoisocaproate from L-leucine by an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing an L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris* [J]. **Scientific Reports**, 2015, 5:12614.
- [23] CHENG J, XU G, HAN R, et al. Efficient access to L-phenylglycine using a newly identified amino acid dehydrogenase from *Bacillus clausii* [J]. **RSC Advances**, 2016, 6(84):80557-80563.
- [24] CHEN H, HUANG R, ZHANG Y H P. Systematic comparison of co-expression of multiple recombinant thermophilic enzymes in *Escherichia coli* BL21(DE3) [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2017, 101(11):4481-4493.