



## 大肠杆菌 NAD<sup>+</sup>合成关键酶的克隆表达及发酵优化

施慧, 穆晓清\*, 杨兴龙, 战绍斌, 田荣臻, 聂尧, 徐岩

工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学酿酒科学与酶技术中心, 江苏 无锡 214122

**摘要:**【目的】烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)在细胞基因表达、氧化还原反应、能量代谢以及调控细胞生命周期中具有重要的作用, 其细胞内含量是能量效率的关键因素。强化辅因子合成策略, 获得高产 NAD<sup>+</sup>菌株, 对于 NAD<sup>+</sup>依赖型氧化还原反应的速率和调节相关生化合成途径的代谢流具有重要意义。

【方法】首先通过内源性调节, 对代谢途径中的关键酶基因进行强化, 过量表达和共表达 NAD<sup>+</sup>合成途径中的关键酶基因 *pncB*、*nadD* 和 *nadE*; 其次, 通过外源调节增加 NAD<sup>+</sup>前体物, 优化诱导条件提高发酵过程中关键酶的表达量, 增加 NAD<sup>+</sup>的合成量; 最后在单因素优化试验的基础上, 以 NAD<sup>+</sup>含量为响应值, 采用 Box-Bohnken 试验设计方法, 研究 3 个显著性影响因素相互作用对 NAD<sup>+</sup>积累量的影响, 确定最佳的优化条件。【结果】根据关键酶基因强化策略, 构建了 7 株重组菌, 其中重组菌 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 胞内 NAD<sup>+</sup>含量相比初始菌株 *E. coli* BL21/pET-21a 提高了 405.2%。通过对该菌株诱导条件和 NAD<sup>+</sup>合成前体的优化, 使用 Design Expert 8.0 分析实验数据, 得出该重组菌株的最佳发酵条件为: 诱导温度控制在 15–20 °C, *OD*<sub>600</sub> 为 0.6–0.8 时添加 IPTG 0.63 mmol/L、烟酸 15.8 mg/L、诱导时长控制在 24 h。NAD<sup>+</sup>含量在最优条件下实验验证值可达 43.16 μmol/g DCW, 与优化前相比提高了 123.6%, 与初始菌株相比提高了 1029.8%。【结论】在大肠杆菌中共表达关键酶基因 *pncB* 和 *nadE*, 胞内 NAD<sup>+</sup>合成量明显增加, 前体物以及诱导条件的外源调节使 NAD<sup>+</sup>积累量达到最佳优化值。实现了提高 NAD<sup>+</sup>含量的目标, 胞内辅因子浓度的增加为提高生物催化效率奠定了可行性基础。

**关键词:** 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 大肠杆菌, *pncB*, *nadD*, *nadE*, NAD<sup>+</sup>前体物质, 发酵优化

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide), 是一种传递电子(氢离子)的辅酶, KEGG 数据库显示 NADH/NAD<sup>+</sup>作为重要的辅因子全程参与微生物细胞内的 740 多个代谢反

应<sup>[1-4]</sup>, 在糖酵解、糖异生、三羧酸循环和呼吸链中发挥着不可替代的作用。NAD(H)能为代谢网络中各种反应提供能量和氧化还原力, 其浓度可以调控代谢网络途径, 增大代谢流通量, 提高氧化

基金项目: 国家“863 计划”(2015AA021004); 国家自然科学基金(21336009, 21176103); 高等学校学科创新引智计划(111-2-06)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918201; E-mail: xqmu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-11-04; 修回日期: 2016-12-21; 网络出版日期: 2016-12-29

还原反应中生物催化效率和目标产物的产率；两者的比例对胞内的氧化还原力水平有一定的调节作用，同时影响代谢产物的分布。

调控 NAD(H) 的浓度可以改变细胞代谢功能，大量增加 NAD<sup>+</sup> 的供给能扩大代谢网络通量，氧化型产物会相对增加<sup>[5]</sup>；在大肠杆菌中，当 NADH/NAD<sup>+</sup> 比例超过 0.6 时，细胞中 NADH 的生成速率超过电子传递链氧化磷酸化容量，代谢产物为乙酸积累<sup>[6]</sup>；降低 NAD(H) 浓度，会制约质子梯度的形成，ATP 生成量减少，糖酵解和三羧酸循环代谢流的效率随之降低<sup>[6-7]</sup>。例如在利用光滑拟球酵母生产丙酮酸过程中，增加 NAD<sup>+</sup> 的含量，增强了 3-磷酸甘油醛酶的活力，从而加快糖酵解的速率，提供其氧化推动力，使丙酮酸产量提高了 44%<sup>[8]</sup>。当提高胞内 NAD<sup>+</sup> 含量时，NAD<sup>+</sup> 依赖型氧化还原反应速率也随之提高。研究表明在酶促催化生成 L-叔亮氨酸氧化还原反应中，外加 0.1 mmol/L NAD<sup>+</sup> 能在 5 h 内实现 100% 转化，不添加或者少添加辅酶，则不能实现完全转化<sup>[9]</sup>。Wu 等在利用胞内 NAD<sup>+</sup> 含量达 1.45 μmol/g 的活细胞作为生物催化剂时，生物催化效率提高 15 倍<sup>[10]</sup>。外加辅酶虽然能提高反应速率，但是价格比较昂贵增加了生产成本，于是很多人开始研究提高细胞自身的辅酶浓度来增强相关代谢反应的效率。

然而，胞内 NAD<sup>+</sup> 合成途径复杂、前体物及 NAD<sup>+</sup> 降解支路多、积累量少以及合成效率低等都是细胞利用自身 NAD<sup>+</sup> 的瓶颈问题，因此，如何增加胞内 NAD<sup>+</sup> 含量提高其利用率成为国内外研究热点。强化辅酶合成主要从增加途径中的关键酶和增加前体物两方面考虑。Berríos-Rivera 等<sup>[11]</sup> 通过过量表达基因 *pncB* 编码的烟酸磷酸核糖转移酶 (NAPRTase)，促使 *E. coli* 胞内 NAD<sup>+</sup>、NADH 和总 NAD(H) 分别提高了 81.8%、29.8% 和 41.7%；Gou 等<sup>[12]</sup> 通过在 *E. coli* NZN111 中过量表达基因 *nadD* 编码的烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶

(NAMNAT)，NAD<sup>+</sup> 浓度提高 3.3 倍可达到 12.64 μmol/g DCW，从而减少了副产物丙酮酸的积累促进丁二酸的合成。Liu 等<sup>[8]</sup> 在发酵培养基中加入 NAD<sup>+</sup> 的生物合成前体烟酸 (NA)，发现 8 mg/L 前体物 NA 能够有效促进细胞内 NAD<sup>+</sup> 的合成，使光滑球拟酵母 *Torulopsis glabrata* 葡萄糖消耗速度和丙酮酸产量分别提高了 48.4% 和 29%。

目前的报道，大多数是针对某一发酵产物改变辅酶的浓度，并没有以辅酶为主要研究对象，对不同代谢调控策略进行比较。缺少对合成 NAD<sup>+</sup> 的系统研究，如：比较 NAD<sup>+</sup> 补救途径中 3 个关键酶作用大小，考察不同前体色氨酸、天冬氨酸、喹啉酸、烟酸和烟酰胺等对 NAD<sup>+</sup> 含量的影响。

本研究主要从代谢途径、前体物质添加和发酵条件优化这三方面对提高胞内 NAD<sup>+</sup> 含量进行系统研究。首先研究 NAD<sup>+</sup> 的生物合成路径见图 1<sup>[13-14]</sup>，改造补救途径，强化关键酶基因 *pncB*、*nadD* 和 *nadE*，比较单独过量表达和组合共表达对胞内 NAD<sup>+</sup> 含量的影响，研究这 3 个关键基因之间的关系；其次，筛选出最优菌株对其进行外源调节，包括不同前体物质的添加、外部环境的调控，进一步提高 NAD<sup>+</sup> 积累量；最后，考察 3 个影响 NAD<sup>+</sup> 含量的显著性因素，通过最陡爬坡试验逼近最大响应区域，得到最佳的发酵条件使胞内 NAD<sup>+</sup> 含量能够达到最大化，为解决高效利用底物、增加目标产物和提高 NAD(H) 依赖型生物催化反应效率等问题提供思路和方案。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株质粒与引物：**菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3) 由本实验室保存，表达质粒 pET-21a(+) 由本实验室前期构建与保存，本文所使用的引物序列见表 1。

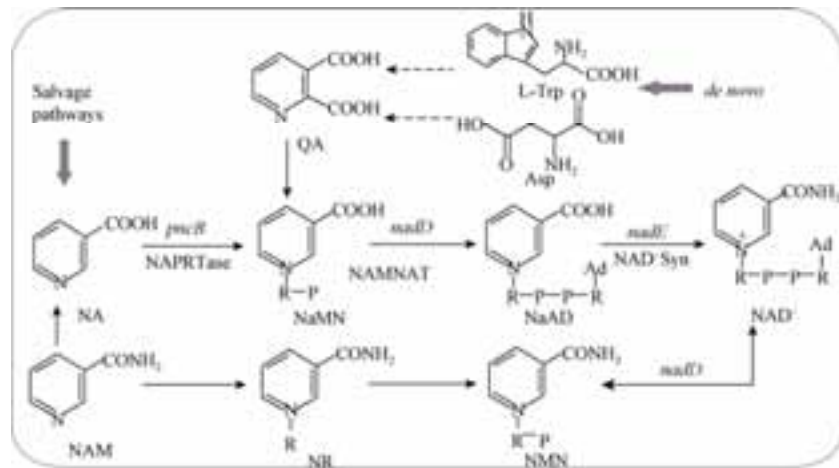
图 1. 辅酶 NAD<sup>+</sup>合成图

Figure 1. Illustration of NAD<sup>+</sup> synthetic pathways. Chemical structures of NAD<sup>+</sup> and relevant intermediates (R: ribose sugar, P: phosphoric acid, Ad: adenine). Abbreviations of compounds: L-Trp: L-tryptophane; Asp: aspartic acid; QA: quinolinic acid; NA: nicotinic acid; NaMN: nicotinic acid mononucleotide; NaAD: nicotinic acid adenine dinucleotide (Deamino-NAD); NAD<sup>+</sup>: nicotinamide adenine dinucleotide; NAM: nicotinamide; NR: nicotinamide riboside; NMN: nicotinamide mononucleotide.

表 1. 基因克隆所用到的引物

Table 1. The sequences of primers used in gene cloning

Primers names	Primer sequences (5'→3')
<i>pncB</i> -F	CGCGGATCCATGACACAATTCGCTTCT
<i>pncB</i> -R	CCGCTCGAGTTAACTGGCTTTTTTAATATGCGG
<i>nadD</i> -F	CGCGGATCCATGAAATCTTTACAGGCTC
<i>nadD</i> -R	CCGCTCGAGTCAGCGATAACAAGCCTTGTT
<i>nadE</i> -F	CGCGGATCCATGACATTGCAACAACAAT
<i>nadE</i> -R	CCGCTCGAGTTACTTTTTCCAGAAATCATCG
B-SD-AS-D-F1	CGCGGATCCATGACACAATTCGCTTCT
B-SD-AS-D-R1	<b>TGTATATCTCCTTCTTTAACTGGCTTTTTTAATATGCGGAAG</b>
B-SD-AS-D-F2	<b>AGAAGGAGATATACAATGAAATCTTTACAGGCTCTGTTTG</b>
B-SD-AS-D-R2	CCGCTCGAGTCAGCGATAACAAGCCTT
B-SD-AS-E-F1	CGCGGATCCATGACACAATTCGCTTCT
B-SD-AS-E-R1	<b>TGTATATCTCCTTCTTTAACTGGCTTTTTTAATATGCGG</b>
B-SD-AS-E-F2	<b>AGAAGGAGATATACAATGACATTGCAACAACAATAATAAAGGC</b>
B-SD-AS-E-R2	CCGCTCGAGTTACTTTTTCCAGAAATCATCG
D-SD-AS-E-F1	CGCGGATCCATGAAATCTTTACAGGCTC
D-SD-AS-E-R1	<b>TGTATATCTCCTTCTTCAGCGATAACAAGCCTTGTTGGT</b>
D-SD-AS-E-F2	<b>AGAAGGAGATATACAATGACATTGCAACAACAATAATAAAGGC</b>
D-SD-AS-E-R2	CCGCTCGAGTTACTTTTTCCAGAAATCATCG
E-SD-AS-B-F1	CGCGGATCCATGACATTGCAACAACAATAATAAAGGC
E-SD-AS-B-R1	<b>TGTATATCTCCTTCTTTACTTTTTCCAGAAATCATCG</b>
E-SD-AS-B-F2	<b>AGAAGGAGATATACAATGACACAATTCGCTTCT</b>
E-SD-AS-B-R2	CCGCTCGAGTTAACTGGCTTTTTTAATATGCGG

The restriction endonuclease sites are underlined; the sequences of SD-AS linker are bold.

**1.1.2 主要试剂:** PCR 试剂、限制性内切酶、pMD™19-T Vector Cloning Kit、T4 DNA 连接酶、DNA marker 购自大连宝生物工程有限公司; protein marker (low) 购于碧云天; 质粒小量抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 引物、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG 购自上海生工生物工程有限公司; NAD<sup>+</sup>、NADH 购自 Sigma Aldrich 公司; 酵母膏提取物、胰蛋白胍 Oxoid 原装进口; 其余分析级生化试剂均购自国药集团。

**1.1.3 培养基及培养条件:** 摇瓶种子培养基及发酵培养基均采用 LB 培养基 (NaCl 10 g/L、胰蛋白胍 10 g/L、酵母膏提取物 5 g/L, pH 7.2), 并添加终浓度为 100 μg/mL 的氨苄青霉素; 培养条件为 37 °C、200 r/min。除摇瓶发酵培养时间为 18 h 外, 其余情况均培养 12 h。

## 1.2 基因 *pncB*、*nadD* 和 *nadE* 的克隆

根据 NCBI 上报道的大肠杆菌中基因 *pncB* 的序列 (Gene ID: 8182321)、基因 *nadD* 的序列 (Gene ID: 8180157) 和基因 *nadE* 的序列 (Gene ID: 8179982) 设计上下游引物, 提取 *E. coli* BL21(DE3) 的基因组, PCR 克隆扩增得到基因 *pncB*、*nadD* 和 *nadE*, 引入酶切位点 *Bam*HI 和 *Xho*I。PCR 反应体系 (50 μL): 上下游引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, PrimeSTAR HS (Premix) 25 μL, dd H<sub>2</sub>O 22 μL。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 分别延伸 80 s、42 s、55 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用琼脂糖凝胶电泳法验证 PCR 扩增结果。

## 1.3 单基因重组质粒的构建

先将目的基因产物纯化后, 连接到 pMD-19T 载体, 转化筛选阳性克隆并测序。再将载体

pET-21a 和 T 载上的目的基因用限制性核酸内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切 90 min, 经琼脂糖凝胶电泳回收纯化目的基因片段和质粒骨架, 在 T4 连接酶作用下 16 °C 连接过夜。然后将连接产物转化 JM109 克隆宿主感受态细胞, 在氨苄青霉素抗性平板上筛选阳性克隆转化子。最后挑取转化子, 并提取质粒双酶切验证, 转化大肠杆菌表达宿主 BL21(DE3), 对重组质粒进行平板筛选和测序。

## 1.4 双基因共表达重组质粒的构建

关键基因两两组合共表达的构建流程如图 2 所示, 其中以 *Bam*HI 和 *Xho*I 为酶切位点, SD-AS 序列为共表达体系中的连接肽, 将 2 个基因扩增并连接在载体上。

## 1.5 NAD(H)合成相关酶的诱导表达

用 LB 氨苄青霉素平板活化重组菌株, 挑取单菌落接入 5 mL 含有终浓度 100 μg/mL 氨苄青霉素

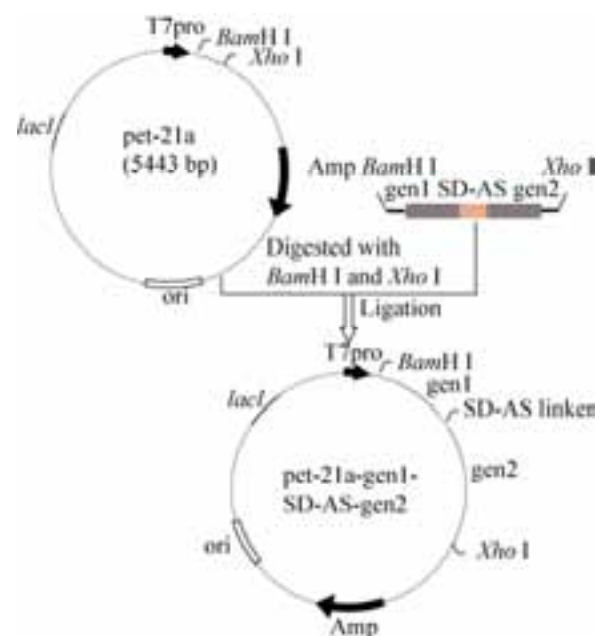


图 2. 双基因组合共表达载体的构建图谱  
Figure 2. Map of construction of double gene combined co-expression vector.

的 LB 试管中, 培养 12 h 后再按 1% 的接种量转接于 50 mL 的 LB 发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 3 h 后添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 17 °C、200 r/min 诱导 15 h 后进行 SDS-PAGE 分析和 NAD<sup>+</sup>含量的测定。

### 1.6 NAD(H)含量的测定

样品中 NAD<sup>+</sup>的提取: 收集细胞到离心管内并用超纯水重悬, 弃上清, 称取 0.1 g 湿菌体, 加入 1 mL 酸性提取液, 超声波破碎(冰浴, 功率 20% 或 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次), 95 °C 水浴 5 min (盖紧, 以防止水分散失); 冰浴中冷却后, 10000×g、4 °C 离心 10 min; 取 500 μL 上清液, 加 500 μL 碱性提取液使之中和, 混匀。10000×g、4 °C 离心 10 min, 取上清, 置冰上待测<sup>[15-16]</sup>。

测定原理: 采用酶循环法, 由于 NAD<sup>+</sup>可被乙醇脱氢酶还原为 NADH, NADH 通过递氢作用, 还原氧化型噻唑蓝(MTT)为甲瓖, 在 570 nm 下检测吸光值的变化。辅酶 NAD(H)浓度测定的具体操作步骤参照文献[17-20]。

### 1.7 重组菌株生物量的测定

细胞培养结束后, 12000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用超纯水洗涤、离心, 去除菌体表面粘附的杂质成分, 再将离心好的菌体在抽真空的条件下冷冻干燥至恒重, 测定细胞干重(Dry cell weight, DCW)。

### 1.8 NAD(H)合成前体物质的添加

在发酵培养基中添加 NAD(H)合成路径中的前体物质, 即色氨酸、天冬氨酸、喹啉酸、烟酸和烟酰胺。前体物质用超纯水配制成 5 g/L 的母液, 过滤除菌、分装并低温保存, 在转接于摇瓶发酵培养基时加入。

## 2 结果和分析

### 2.1 NAD<sup>+</sup>合成途径中单个关键基因的克隆及表达

选取 NAD<sup>+</sup>补救途径中烟酸磷酸核糖转移酶(NAPRTase)、烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶(NAMNAT)和 NAD<sup>+</sup>合成酶(NAD<sup>+</sup> synthetase)的编码基因, 克隆构建获得重组质粒 pET-21a-*pncB*、pET-21a-*nadD* 和 pET-21a-*nadE*, 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切鉴定, 其条带大小分别为 1203、642 和 828 bp (图 3-A), 经测序后比对匹配一致, pET-21a-*pncB*、pET-21a-*nadD* 和 pET-21a-*nadE* 构建成功。

对 *E. coli* BL21/pET-21a 和构建的重组菌株进行粗酶液的 SDS-PAGE 分析验证(图 3-B)。与空白组 4 号泳道对比, 重组菌 *E. coli* BL21/pET-21a-*pncB*、BL21/pET-21a-*nadD* 和 BL21/pET-21a-*nadE* 分别在约 45、25 和 35 kDa 处有一条明显特征条带, 表明基因 *pncB*、*nadD* 和 *nadE* 编码的 NAPRTase、NAMNAT 和 NAD<sup>+</sup> synthetase 在大肠杆菌中成功表达。

分别测定重组菌株的生长情况和胞内辅酶 NAD<sup>+</sup>含量(表 2), 在细胞量上, 重组菌株的生物量较原始菌株提高 20%; 在 NAD<sup>+</sup>含量上, 重组菌株中合成 NAD<sup>+</sup>关键酶基因 *pncB*、*nadD* 和 *nadE* 得到了过量表达, 胞内 NAD<sup>+</sup>的浓度分别提高了 252.4%、101.7% 和 275.4%。可见, 过量表达关键酶基因可以使细胞生物量和 NAD<sup>+</sup>总量得到一定的提高。3 株重组菌之间也有一定的差异, 其中基因 *pncB* 和 *nadE* 的过量表达对提高辅酶含量的比例较大, 而基因 *nadD* 提高辅酶的幅度稍小。

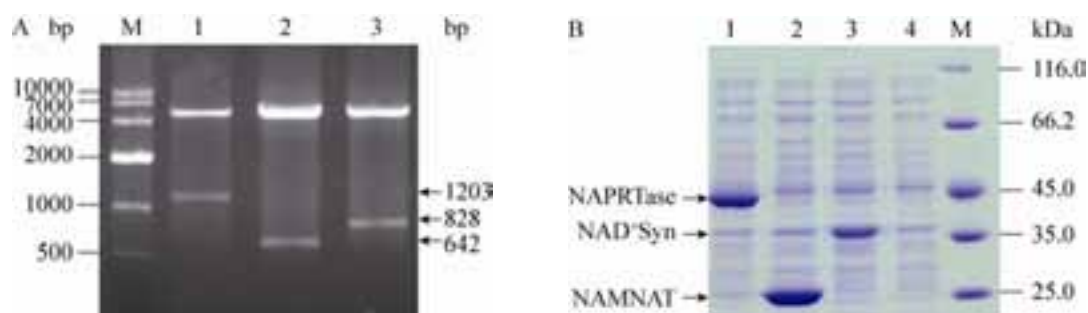


图 3. 重组质粒双酶切鉴定及 SDS-PAGE 分析图

Figure 3. SDS-PAGE analysis and identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion. A: identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion. Lane 1: pET-21a-*pncB*; lane 2: pET-21a-*nadD*; lane 3: pET-21a-*nadE*; M: DL10000 DNA marker. B: SDS-PAGE analysis of recombinant strains for over-expressed enzyme. Lane 1: pET-21a-*pncB*; lane 2: pET-21a-*nadD*; lane 3: pET-21a-*nadE*; lane 4: pET-21a; M: protein molecular marker.

表 2. 过表达单基因重组菌株生长情况及 NAD<sup>+</sup>含量

Table 2. Growth and the amount of NAD<sup>+</sup> in recombinant strains for over-expressing a single gene

Recombinant strains	<i>OD</i> <sub>600</sub>	Biomass/(g DCW/L)	NAD <sup>+</sup> content/( $\mu$ mol/g DCW)	Relative ratio/%
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a	1.29 $\pm$ 0.07	1.40 $\pm$ 0.03	3.78 $\pm$ 0.37	100.00
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a- <i>pncB</i>	1.75 $\pm$ 0.08	1.69 $\pm$ 0.04	13.31 $\pm$ 1.20	352.35 $\pm$ 31.73
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a- <i>nadD</i>	1.85 $\pm$ 0.07	1.72 $\pm$ 0.07	7.63 $\pm$ 0.08	201.67 $\pm$ 16.92
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a- <i>nadE</i>	1.82 $\pm$ 0.17	1.71 $\pm$ 0.13	14.19 $\pm$ 0.69	375.40 $\pm$ 18.11

## 2.2 NAD<sup>+</sup>合成途径中 2 个关键基因共表达的克隆及表达

为进一步提高胞内 NAD<sup>+</sup>的含量,采用共表达策略,利用重叠延伸 PCR 技术构建重组质粒 pET-21a-*pncB-nadD*、pET-21a-*nadD-nadE*、pET-21a-*pncB-nadE* 和 pET-21a-*nadE-pncB*。

经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定(图 4),5000 bp 左右的条带为质粒骨架 pET-21a 而稍小的条带为目的基因。经过测序比对,目的条带序列与已公布的匹配一致,共表达重组质粒构建成功。



图 4. 双酶共表达重组质粒的酶切验证

Figure 4. Identification of the co-expression recombinant plasmid by enzyme digestion. Lane 1: pET-21a-*pncB-nadD*; lane 2: pET-21a-*nadD-nadE*; lane 3: pET-21a-*pncB-nadE*; lane 4: pET-21a-*nadE-pncB*; M: DL5000 DNA marker.



离心收集共表达重组菌株细胞,测定其胞内辅酶NAD<sup>+</sup>的含量和细胞干重(表3),重组菌 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 胞内 NAD<sup>+</sup>含量进一步提高,而 *E. coli* BL21/pET21a-*pncB-nadD* 胞内的辅酶含量比较低,结合 SDS-PAGE 图(图5)发现基因 *pncB* 编码的 NAPRTase 和 *nadD* 编码的 NAMNAT 表达量较低。

与 *E. coli* BL21/pET-21a 相比, NAD<sup>+</sup>合成途径中关键酶组合共表达后,对于 NAD<sup>+</sup>的含量和细胞干重产生了不同的效应。在生物量上,与 *E. coli* BL21/pET-21a 相比,共表达双基因重组菌均有所提高。在 NAD<sup>+</sup>含量上,重组菌株虽然均有所提高,

但是它们之间也存在较大的差异性。*E. coli* BL21/pET-21a-*pncB-nadD* 胞内 NAD<sup>+</sup>含量相对比例为 148%,略低于单个表达基因 *pncB* 和 *nadD*; *E. coli* BL21/pET-21a-*nadD-nadE* 胞内 NAD<sup>+</sup>含量相对比例为 372%,与过表达单个基因 *nadE* 时提高了 2.75 倍基本一致;而 *E. coli* BL21/pET-21a-*pncB-nadE* 和 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 都具有叠加效应,比单个基因过量表达时效果更好,这两者之间由于次序不同, NAD<sup>+</sup>含量相差 3 μmol/g DCW,提高的比例相差 77.7%,*E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 相对 *E. coli* BL21/pET-21a-*pncB-nadE* 提高了 18.2%。

表 3. 双基因共表达重组菌株生长情况及 NAD<sup>+</sup>含量

Table 3. Growth and the amount of NAD<sup>+</sup> in recombinant strains for double gene co-expression

Recombinant strains	OD <sub>600</sub>	Biomass/(g DCW/L)	NAD <sup>+</sup> content/(μmol/g DCW)	Relative ratio/%
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a	1.29±0.07	1.40±0.04	3.82±0.27	100
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a- <i>pncB-nadD</i>	2.02±0.12	1.75±0.14	5.67±0.21	148.43±5.50
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a- <i>nadD-nadE</i>	1.81±0.07	1.68±0.16	14.21±0.58	371.99±15.18
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a- <i>pncB-nadE</i>	1.82±0.06	1.60±0.10	16.33±0.93	427.49±24.34
<i>E. coli</i> BL21/pET-21a- <i>nadE-pncB</i>	1.65±0.09	1.57±0.15	19.30±0.65	505.23±17.02

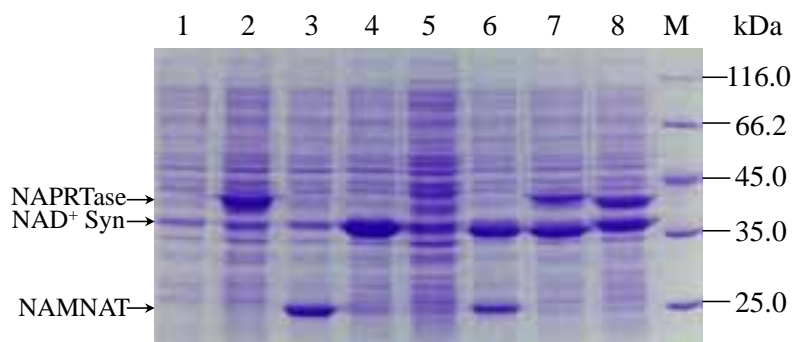


图 5. 双酶共表达重组菌株的 SDS-PAGE 分析

Figure 5. SDS-PAGE analysis of recombinant strains for double-enzyme co-expression. Lane 1: BL21/pET-21a; lane 2: BL21/pET-21a-*pncB*; lane 3: BL21/pET-21a-*nadD*; lane 4: BL21/pET-21a-*nadE*; lane 5: BL21/pET-21a-*pncB-nadD*; lane 6: BL21/pET-21a-*nadD-nadE*; lane 7: BL21/pET-21a-*pncB-nadE*; lane 8: BL21/pET-21a-*nadE-pncB*; M: protein cellular marker.

### 2.3 诱导条件对 NAD<sup>+</sup>合成的影响

重组菌株中 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 合成 NAD<sup>+</sup>的能力最强,为了探究诱导条件对该重组菌株胞内 NAD<sup>+</sup>合成积累的影响,对诱导条件进行优化,包括诱导温度、诱导时机、诱导时长和 IPTG 添加量。

测定不同诱导温度下 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 的 NAD<sup>+</sup>含量(图 6-A),发现诱导温度对辅酶含量影响很大。诱导温度高于 25 °C 时, NAD<sup>+</sup>的含量下降明显。过高的诱导温度会影响酶的活性和表达,导致关键酶 NAPRTase 和 NAD<sup>+</sup> synthetase 表达不正常,影响 NAD<sup>+</sup>的合成<sup>[14]</sup>。当诱导温度维持在 15–20 °C 之间,辅酶含量较高,

且波动较小,表明低温有利于胞内 NAD<sup>+</sup>的合成和积累。

不同浓度的诱导剂对 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 胞内 NAD<sup>+</sup>的影响较大(图 6-D),发现随着 IPTG 添加量的增加, NAD<sup>+</sup>含量的变化趋势是先增加后降低,当 IPTG 浓度达到 0.6 mmol/L 时, NAD<sup>+</sup>含量到达较大值, IPTG 浓度维持在 0.4–0.8 mmol/L 时, NAD<sup>+</sup>含量能够稳定在 30 μmol/g DCW。

诱导时机和诱导时长对 NAD<sup>+</sup>含量也有一定的影响(图 6-B/C),在  $OD_{600}$  为 0.6 时诱导最佳。诱导培养 24 h 辅酶含量达到较大值,随着时间继续延长,辅酶的含量开始下降。发酵后期培

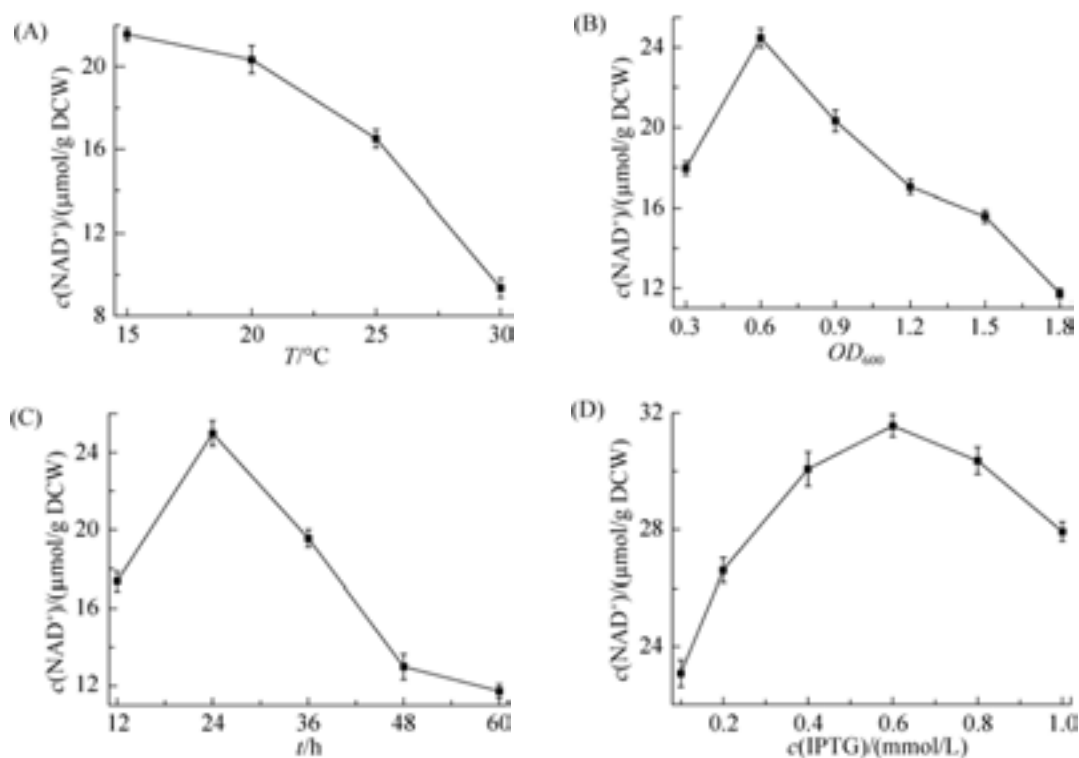


图 6. 诱导条件优化对 NAD<sup>+</sup>含量的影响

Figure 6. Effect of inducing conditions optimization on the content of NAD<sup>+</sup>. A: effect of induction temperature on NAD<sup>+</sup> content. B: effect of induced occasion on NAD<sup>+</sup> content. C: effect of induction duration on NAD<sup>+</sup> content. D: effect of IPTG content on NAD<sup>+</sup> concentration. Standard deviation is the dispersion degree of 3 parallel experimental data relative to mean value. Data in A, B, C and D are the mean±S.D. of triplicate samples.



养时间过长, 不仅造成培养基中的营养物质不足, 大肠杆菌生长受到抑制, 而且随着代谢副产物的大量生成, 会不断消耗  $\text{NAD(H)}$ <sup>[21]</sup>。因此, 控制诱导时长对辅酶  $\text{NAD}^+$  的积累量有重要意义。

## 2.4 前体物质对 $\text{NAD}^+$ 合成的影响

$\text{NAD(H)}$  从头合成途径是以天冬氨酸、色氨酸或者喹啉酸为前体, 而补救合成途径中是以烟酸和烟酰胺作为烟酸单核苷酸(NaMN)的前体, 进一步合成  $\text{NAD}^+$ 。因此, 添加终浓度为 20 mg/L 的前体物质:

色氨酸、天冬氨酸、喹啉酸、烟酸和烟酰胺, 分别测定胞内辅酶  $\text{NAD}^+$  含量以及生物量的变化情况。

由表 4 可知, 添加不同的前体物质, 对共表达重组菌 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 胞内  $\text{NAD}^+$  的含量均有一定的影响, 其中添加烟酸的效果最为明显, 较空白对照组提高 69.4%。当细胞内大量存在上述  $\text{NAD}^+$  前体时, 补救途径中被强化的关键酶 NAPRTase 和  $\text{NAD}^+$  synthetase, 大量利用前体物质重新合成  $\text{NAD}^+$ 。

表 4. 添加不同前体对辅酶含量及生物量的影响

Table 4. Effect of different precursors on coenzyme content and biomass

Different precursors	$c(\text{NAD}^+)/(\mu\text{mol/g DCW})$	Biomass liveweight/(g DCW/L)	Relative ratio/%
Control group	18.98±0.93	1.23±0.05	100
Tryptophane	23.53±1.33	1.01±0.04	123.97
Aspartic acid	25.39±1.10	1.14±0.07	133.77
Quinolinic acid	27.96±0.91	1.12±0.07	147.31
Nicotinamide	29.64±1.27	1.13±0.06	156.16
Nicotinic acid	32.16±1.28	1.24±0.06	169.44

优化烟酸的添加量(图 7), 当烟酸浓度为 15–20 mg/L 时,  $\text{NAD}^+$  含量维持在 32  $\mu\text{mol/g DCW}$  左右, 而当添加的烟酸超过 20 mg/L 后  $\text{NAD}^+$  含量逐渐下降。随着烟酸浓度的增加, 整个培养基的 pH 值也有一定的降低, 烟酸含量超过 40 mg/L 时, pH 降低至 6.5 左右。因此, 控制烟酸的添加量是提高胞内辅酶含量要考虑的重要因素之一。

## 2.5 响应面优化 $\text{NAD}^+$ 合成的发酵条件

### 2.5.1 响应面试验设计与结果分析:

在单因素优化结果的基础上, 选择对  $\text{NAD}^+$  含量影响较大的 3 个因素(IPTG 浓度、烟酸浓度和诱导时长), 取-1、0、1 代表量的 3 个水平, 以  $\text{NAD}^+$  含量为响应值建立二次响应面分析模型。共进行 17 个试验, 其中 12 个为析因点, 5 个为零点用于估算误差。每

个试验重复 3 次, 实验结果表示为测定结果的平均值正负标准偏差。响应面因素与水平见表 5。

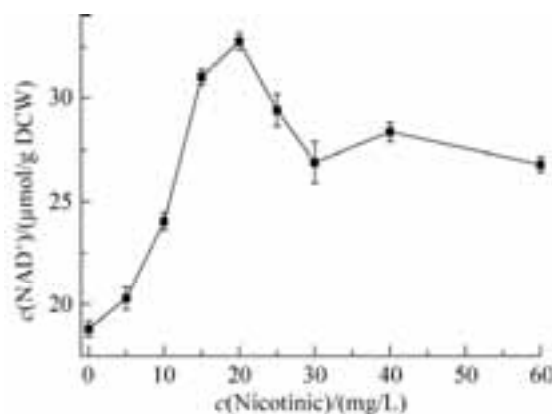


图 7. 不同浓度烟酸对  $\text{NAD}^+$  含量的影响

Figure 7. Effect of different concentrations of nicotinic acid on the  $\text{NAD}^+$  content. Standard deviation is the dispersion degree of 3 parallel experimental data relative to mean value. Data in figure is the mean±S.D. of triplicate samples.

表 5. CCD 实验设计因素水平及编码值

Table 5. CCD experimental design factors level and coded values.

Factors	Level		
	-1	0	1
c(A-IPTG)/(mmol/L)	0.4	0.6	0.8
c(B-Nicotinic acid)/(mg/L)	10.0	15.0	20.0
C-induction duration/h	20.0	24.0	28.0

利用 Design-Expert 8.0 对响应面实验结果 (表 6) 进行二次多元回归分析, 除去不显著项得到模型的二次多项回归方程为:  $Y=42.47+1.44A+1.37B-1.26AC-4.81A^2-4.47B^2-1.52C^2$ 。由表 7 可知, 模型  $P<0.0001$ , 而失拟项不显著 ( $P=0.1853>0.05$ )。同时, 复相关系数  $R^2_{Adj}$  为 97.7%, 说明该模型具有拟合度好、误差较小的特点, 可用于预测  $NAD^+$  含量的最佳条件。

**2.5.2 响应曲面图分析:** IPTG 添加量、烟酸添加量和诱导时长 3 个因素间交互作用对  $NAD^+$  含量的影响如图 8 所示。IPTG 与诱导时长交互作用对  $NAD^+$  的影响较大, 其曲线图最陡峭, 随着 IPTG

浓度和诱导时长的增加,  $NAD^+$  含量呈先上升后降低的趋势。然而, AB 以及 BC 之间的交互作用对  $NAD^+$  含量的曲面图较为平滑, 影响不显著。

**2.5.3 验证试验结果:** 在实验因素的水平范围内预测菌株 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 胞内  $NAD^+$  含量的最佳培养条件为: IPTG 添加量 0.63 mmol/L、烟酸添加量 15.8 mg/L、诱导时长为 24 h, 此时的  $NAD^+$  含量理论预计值为 42.69  $\mu\text{mol/g}$  DCW。在最优条件下进行 3 次验证试验检验回归方程预测结果, 实际得到的  $NAD^+$  含量为  $(43.16\pm 0.65)$   $\mu\text{mol/g}$  DCW, 与理论值的平均误差小于 5%。试验结果验证了模型所得到的二次多项回归方程可较准确地预测  $NAD^+$  含量。

表 6. CCD 实验设计及结果

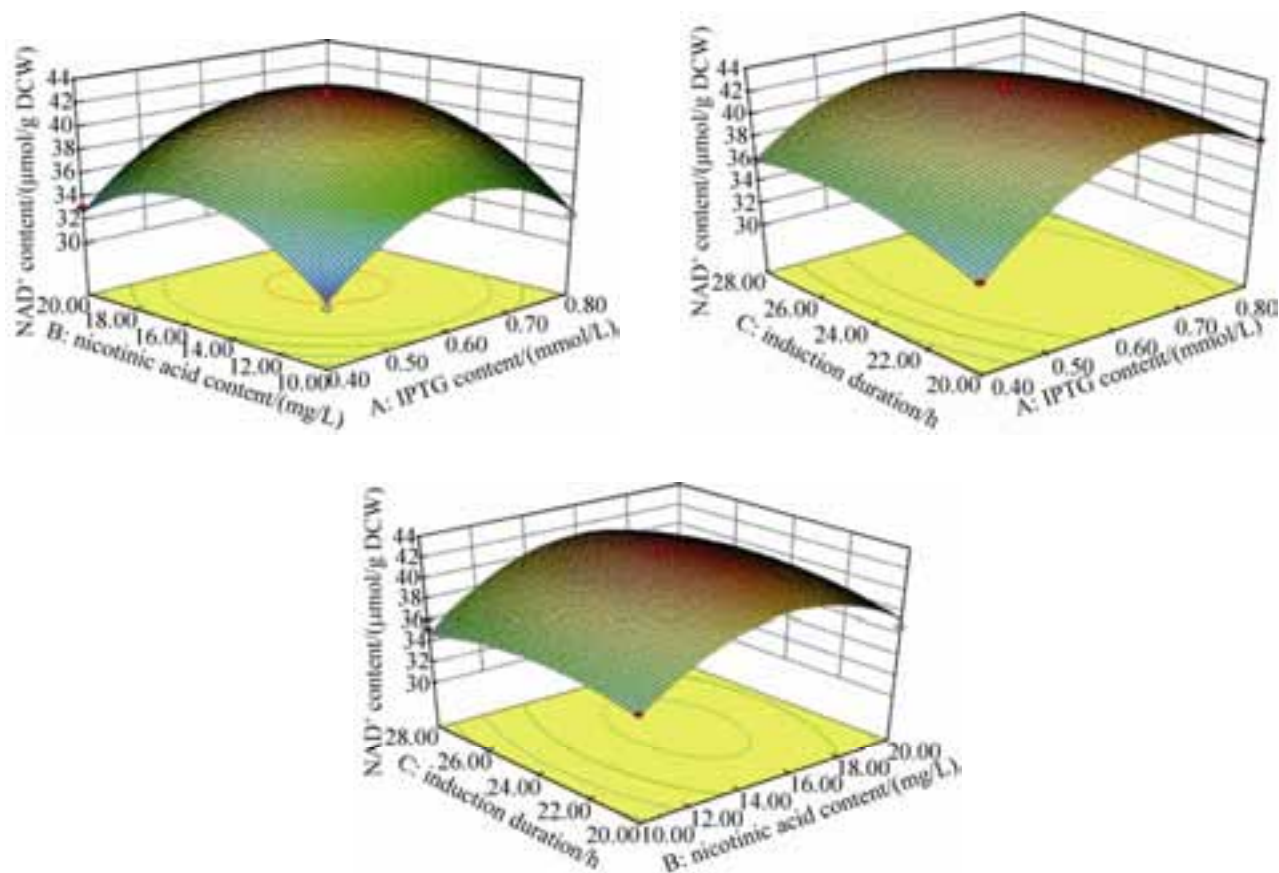
Table 6. CCD experimental design and results

Numbers	Factors			$NAD^+$ content/ $(\mu\text{mol/g})$	
	A	B	C	Actual value	Predicted value
1	0	1	-1	36.81 $\pm$ 0.30	37.40
2	0	-1	-1	35.62 $\pm$ 0.32	35.26
3	-1	0	1	35.90 $\pm$ 0.07	36.06
4	-1	0	-1	33.61 $\pm$ 0.55	33.34
5	1	-1	0	32.49 $\pm$ 1.57	32.82
6	0	0	0	42.38 $\pm$ 0.17	42.47
7	1	0	-1	38.89 $\pm$ 0.39	38.73
8	0	1	1	38.06 $\pm$ 0.26	38.22
9	0	0	0	41.98 $\pm$ 0.18	42.47
10	-1	-1	0	30.32 $\pm$ 0.43	30.75
11	1	1	0	36.88 $\pm$ 0.29	36.38
12	0	0	0	42.75 $\pm$ 0.16	42.47
13	0	0	0	42.12 $\pm$ 0.18	42.47
14	1	0	1	36.13 $\pm$ 0.31	36.40
15	0	-1	1	35.42 $\pm$ 0.29	34.83
16	0	0	0	43.10 $\pm$ 0.16	42.47
17	-1	1	0	33.06 $\pm$ 0.27	32.73

表 7. 响应面方差分析二次模型方差分析表

Table 7. ANOVA for response surface quadratic model analysis of variance

Source	df	Sum of squares	Mean square	F	P	Significance
Model	9	248.30	27.59	76.49	< 0.0001	Significant
A-IPTG content	1	16.53	16.53	45.83	0.0003	
B-NA content	1	15.02	15.02	41.63	0.0003	
C-induction duration	1	0.042	0.042	0.12	0.7428	
AB	1	0.68	0.68	1.89	0.2199	
AC	1	6.38	6.38	17.68	0.0040	
BC	1	0.53	0.53	1.46	0.2666	
A <sup>2</sup>	1	97.49	97.49	270.28	< 0.0001	
B <sup>2</sup>	1	84.01	84.01	232.91	< 0.0001	
C <sup>2</sup>	1	9.75	9.75	27.03	0.0013	
Residual	7	2.52	0.36			
Lack of fit	3	1.68	0.56	2.65	0.1853	Not significant
Pure error	4	0.85	0.21			
Total	16	250.82				

图 8. 3 个因素交互作用对 NAD<sup>+</sup>含量影响的响应面Figure 8. Three-dimensional curved surface for effect of 3 factors interaction on NAD<sup>+</sup> content.

### 3 讨论

论文采用单基因过量表达和双基因共表达策略, 通过调节表达量考察了合成途径 3 个关键酶对辅酶 NAD<sup>+</sup>合成水平的影响, 研究发现单基因过表达重组菌 *E. coli* BL21/pET-21a-*pncB*、*E. coli* BL21/pET-21a-*nadD* 和 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE* 胞内 NAD<sup>+</sup>含量分别提高了 252.4%、101.7% 和 275.4%。三者之间存在的差异可能是由于基因 *nadD* 编码的烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶 (NAMNAT) 既可以催化烟酸单核苷酸 (NaMN) 生成烟酸腺嘌呤二核苷酸 (NaAD) 又可以降解 NAD<sup>+</sup> 生成烟酰胺单核苷酸 (NMN)<sup>[13,22]</sup>。结合实验数据和文献, 发现基因 *pncB* 和 *nadE* 提高 NAD<sup>+</sup>含量的能力比基因 *nadD* 强。

结合双基因共表达重组菌株的实验数据和 NAD<sup>+</sup>合成路径来看, 脱氨基的 NAD<sup>+</sup>在 NAD<sup>+</sup>合成酶催化下氨基化生成 NAD<sup>+</sup>可能直接影响了 NAD<sup>+</sup>的合成量, 基因 *nadE* 在宿主菌 *E. coli* BL21 中对 NAD<sup>+</sup>合成量贡献更大。其中, 重组菌 *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 的 NAD<sup>+</sup>含量提高 405.2%, 结果表明在研究对象 *E. coli* BL21 中, 烟酸磷酸核糖转移酶和 NAD<sup>+</sup>合成酶在 NAD<sup>+</sup>合成途径中起到了关键性的作用。

通过对重组菌株 BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 的诱导条件和 NAD<sup>+</sup>合成途径的关键前体物质进行研究和优化, 增加了蛋白的表达量并保证了菌体生长代谢的良好环境, 有利于 NAD<sup>+</sup>含量的增加与积累, 使胞内 NAD<sup>+</sup>水平维持在 32  $\mu\text{mol/g}$  DCW 左右。

利用响应面分析优化 IPTG 浓度、烟酸浓度及诱导时长, 确定最佳发酵条件, 当诱导温度控制

在 15–20 °C, 在  $OD_{600}$  为 0.6–0.8 时添加 IPTG 0.63 mmol/L, 烟酸 15.8 mg/L, 诱导时长 24 h, *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* 胞内辅酶含量能达到 43.16  $\mu\text{mol/g}$  DCW 左右。与未优化前相比, 胞内 NAD<sup>+</sup>含量提高了 123.6%, 与未强化 NAD<sup>+</sup>合成途径的初始菌株 *E. coli* BL21/pET-21a 相比提高了 1029.8%。对利用细胞自身辅酶 NAD<sup>+</sup>, 促进微生物最大化的合成目标代谢产物, 增加代谢速率, 提高氧化还原反应中生物催化效率具有较好的借鉴性。

### 参考文献

- [1] Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJA, Kötter P, Luttik MAH, van Dijken JP, Pronk JT. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25(1): 15–37.
- [2] Berríos-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Metabolic Engineering*, 2002, 4(3): 217–229.
- [3] San KY, Bennett GN, Berríos-Rivera SJ, Vadali RV, Yang YT, Horton E, Rudolph FB, Sariyar B, Blackwood K. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2002, 4(2): 182–192.
- [4] Sánchez AM, Bennett GN, San KY. Effect of different levels of NADH availability on metabolic fluxes of *Escherichia coli* chemostat cultures in defined medium. *Journal of Biotechnology*, 2005, 117(4): 395–405.
- [5] Heux S, Cachon R, Dequin S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of a H<sub>2</sub>O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(4): 303–314.
- [6] Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3653–3661.
- [7] Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen

- PR. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(14): 3909–3916.
- [8] Liu LM, Li Y, Shi ZP, Du GC, Chen J. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: increase of NAD<sup>+</sup> availability. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(2): 173–185.
- [9] 杨兴龙. 共表达亮氨酸脱氢酶与葡萄糖脱氢酶不对称合成光学纯 L-叔亮氨酸. 江南大学学位论文, 2016.
- [10] Wu XR, Jiang JP, Chen YJ. Correlation between intracellular cofactor concentrations and biocatalytic efficiency: coexpression of diketoreductase and glucose dehydrogenase for the preparation of chiral diol for statin drugs. *ACS Catalysis*, 2011, 1(12): 1661–1664.
- [11] Berríos-Rivera SJ, San KY, Bennett GN. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of NAD, the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2002, 4(3): 238–247.
- [12] Gou DM, Liang LY, Liu RM, Zhang CQ, Wu MK, Ma JF, Chen KQ, Zhu JG, Jiang M. Effect of overexpression of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(9): 1059–1069. (in Chinese)  
苟冬梅, 梁丽亚, 刘嵘明, 张常青, 吴明科, 马江锋, 陈可泉, 朱建国, 姜岷. 过量表达烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶对大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的影响. *生物工程学报*, 2012, 28(9): 1059–1069.
- [13] Jiang JP, Wu XR, Chen YJ. Strategy to solve cofactor issues in oxidoreductase catalyzed biocatalytic applications. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(4): 410–419. (in Chinese)  
江金鹏, 吴旭日, 陈依军. 解决氧化还原酶反应体系中辅酶问题的策略及其应用. *生物工程学报*, 2012, 28(4): 410–419.
- [14] Wang CH, Li YY, Chen CH, Li X. Effects of temperature on the kinetics and level of energy charge and oxidation-reduction state in pyruvate biosynthesis. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22(2): 316–321. (in Chinese)  
王翠华, 李友元, 陈长华, 李啸. 温度对丙酮酸生物合成动力学、能荷和氧化-还原度的影响. *生物工程学报*, 2006, 22(2): 316–321.
- [15] Vinitzky A, Grubmeyer C. A new paradigm for biochemical energy coupling. *Salmonella typhimurium* nicotinate phosphoribosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(34): 26004–26010.
- [16] Li J, Chen KQ, Huang XM, Yang ZN, Jiang M, Wei P. Establishment of the determination of NAD<sup>+</sup> and NADH in the anaerobic fermentation of organic acids. *Food Science and Technology*, 2008, 33(12): 254–257.  
李建, 陈可泉, 黄秀梅, 杨卓娜, 姜岷, 韦萍. 厌氧发酵有机酸体系中 NAD<sup>+</sup>和 NADH 测定方法的建立. *食品科技*, 2008, 33(12): 254–257.
- [17] Gibon Y, Larher F. Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 1997, 251(2): 153–157.
- [18] Sestini S, Jacomelli G, Pescaglini M, Micheli V, Pompucci G. Enzyme activities leading to NAD synthesis in human lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 379(2): 277–282.
- [19] Yamada K, Hara N, Shibata T, Osago H, Tsuchiya M. The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2006, 352(2): 282–285.
- [20] Al-Abady ZN, Durante B, Moody AJ, Billington RA. Large changes in NAD levels associated with CD38 expression during HL-60 cell differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 442(1/2): 51–55.
- [21] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, Baez A, Cho KM, Liao JC. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(9): 2905–2915.
- [22] Dong WR, Sun CC, Zhu G, Hu SH, Xiang LX, Shao JZ. New function for *Escherichia coli* xanthosine phosphorylase (xapA): genetic and biochemical evidences on its participation in NAD<sup>+</sup> salvage from nicotinamide. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 29.

## Cloning and expression of key enzymes for NAD<sup>+</sup> synthesis and optimization of fermentation in *Escherichia coli*

Hui Shi, Xiaoqing Mu<sup>\*</sup>, Xinglong Yang, Shaobin Zhan, Rongzhen Tian, Yao Nie, Yan Xu

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) plays a crucial role in controlling metabolism network. Improving its intracellular concentration or getting a high-NAD<sup>+</sup>-yield strain is of great significance for NAD<sup>+</sup>-dependent redox reaction rate. [Methods] First, we used endogenous regulation means to enhance the key genes of NAD<sup>+</sup> synthesis pathway, such as over-expressing and co-expressing the key enzyme genes *pncB*, *nadD* and *nadE*. Second, we optimized NAD<sup>+</sup> precursors supplement and fermentation conditions to increase NAD<sup>+</sup> synthesis. Finally, we used Box-Bohnken method for optimal synthesis condition by 3 significant factors' interaction based on single-factor experiments and the response value of NAD<sup>+</sup> content. [Results] According to different expression strategies, we constructed seven recombinant strains. Besides, the intracellular NAD<sup>+</sup> content of the recombinant strain *E. coli* BL21/pET-21a-*nadE-pncB* was 405.2% higher than that of the original strain. Moreover, after optimization of induction conditions and NAD<sup>+</sup> precursor concentration by Design Expert 8.0, NAD<sup>+</sup> content reached 43.16 μmol/g DCW, 123.6% higher than that before optimization and 1029.8% higher than the original strain. [Conclusion] Co-expression the key enzyme genes *pncB* and *nadE* are essential to improve NAD<sup>+</sup> synthesis. The recombinant strain with high NAD<sup>+</sup> provides the feasibility to improve biocatalytic efficiency.

**Keywords:** nicotinamide adenine dinucleotide, *E. coli*, *pncB*, *nadD*, *nadE*, NAD<sup>+</sup> precursor, fermentation optimization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Hi-Tech Research and Development Program of China (2015AA021004), by the National Natural Science Foundation of China (21336009, 21176103) and by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918201; E-mail: xqmu@jiangnan.edu.cn

Received: 4 November 2016; Revised: 21 December 2016; Published online: 29 December 2016