



异源 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶共表达重组枯草芽孢杆菌的构建

王亚盟, 班睿*, 刘露, 申雨

天津大学化工学院, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300350

摘要:【目的】构建异源 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶共表达的重组枯草芽孢杆菌, 探讨其作为全细胞催化剂合成 D-对羟基苯甘氨酸的可行性。【方法】采用 P_{aco} 表达盒表达 D-海因酶基因 *hyd* 或 *sd1*, 采用 P_{AE} 表达盒表达 N-氨甲酰水解酶基因 *adc*。分别以质粒 pHP13 和 pUB110 为载体, 构建 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶共表达质粒 pHCS、pHCY 和 pUCS。在受体菌中整合表达了 *acoR* 和 *sigL* 基因, 敲除了 *skf* 和 *sdp* 基因。将共表达质粒分别转化不同的受体菌, 通过测定全细胞催化活性, 表征 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶共表达的效果。【结果】带有质粒 pHCY 和 pHCS 的重组菌, 全细胞催化活性分别为 0.21 U/mL 和 0.31 U/mL。整合表达 *acoR* 和 *sigL* 基因以及高拷贝质粒 pUCS, 使全细胞催化活性达到 1.0 U/mL。【结论】异源 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶在枯草芽孢杆菌中能够正确表达。基因拷贝数、*acoR* 和 *sigL* 基因表达水平, 及 *skf* 和 *sdp* 基因缺失对重组菌的催化活性具有显著影响。

关键词: 枯草芽孢杆菌, D-海因酶, N-氨甲酰水解酶, 全细胞催化剂, D-对羟基苯甘氨酸

D-对羟基苯甘氨酸(D-HPG)是生产多种 β -内酰胺类半合成抗生素的重要中间体, 目前市场年需求量已超过万吨^[1], 海因酶法(hydantoinase process)是最具竞争力的 D-HPG 工业生产方法^[2]。所谓海因酶法, 就是利用海因酶(hydantoinase)、N-氨甲酰水解酶(N-carbamoylase)和消旋酶的联合催化作用, 将 D,L-5-单取代海因转化为光学纯的 L-或 D-氨基酸的生物转化方法^[3]。海因酶法合成 D-HPG 的原料是 D,L-对羟基苯海因, 催化剂是相

应的 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶(N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase)(图 1)。由于 D,L-对羟基苯海因能够自消旋, 所以不需要消旋酶参与反应。

海因酶法生产 D-HPG 的工艺主要有 2 种: 一种是利用游离酶或固定化酶作为催化剂的酶催化法^[4-5], 另一种是利用微生物静息细胞作为催化剂的全细胞催化法。前者由于催化剂制备过程复杂, 催化剂成本过高, 限制了其在工业生产中的应用。

基金项目: 国家“863 计划”(2012AA02A701)

*通信作者。Tel/Fax: +86-22-87402179; E-mail: banrui@tju.edu.cn

收稿日期: 2016-04-13; 修回日期: 2016-05-30; 网络出版日期: 2016-06-03

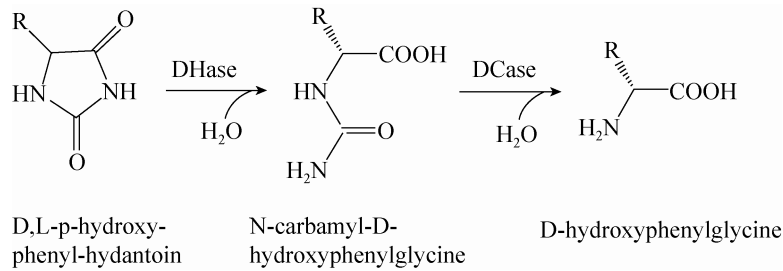


图 1. 海因酶法合成 D-对羟基苯甘氨酸的反应

Figure 1. Synthesis of D-p-Hydroxyphenylglycine by hydantoinase method. R: Hydroxy phenyl.

而全细胞催化法具有催化剂制备简单及成本低的优势,在 D-HPG 工业生产中被普遍采用。最早被用于 D-HPG 工业生产的全细胞催化剂,是分离的具有 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶活性的野生菌^[6-8]。野生菌一般存在 N-氨甲酰水解酶活性缺失或者偏低的不足,造成 D-HPG 生产效率低下。

采用基因工程技术,构建 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶共表达的重组菌,作为全细胞催化剂,能够弥补野生菌的缺陷。但是,到目前为止,所有研究都选择大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为受体菌^[9-13]。在皮氏罗尔斯通菌(*Ralstonia pickettii*)中共表达同源 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶的研究,是唯一的例外^[14]。共表达异源 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶的重组 *E. coli* 用于生产 D-HPG,存在一些难以克服的障碍。例如,共表达的 N-氨甲酰水解酶更容易形成包涵体,造成酶活性的不平衡;过高的表达量对细胞代谢造成极大负担,而难以实现大规模生产^[2-3]。采用表达 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶融合蛋白的方法,也只能部分解决酶活性平衡问题^[15]。另外,*E. coli* 内毒素的存在也是生产医药中间体的不利因素。

革兰氏阳性的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是传统的工业发酵菌株,属于 GRAS (Generally recognized as safe)菌株。以 *B. subtilis* 作为受体菌,可以克服 *E. coli* 的固有缺陷。本研究探讨了异源

D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶在 *B. subtilis* 中共表达的可能性,以及重组 *B. subtilis* 全细胞用于海因酶法生产 D-HPG 的可行性。同时,也考察了 *acoR* 和 *sigL* 基因过表达、增加基因拷贝数和敲除 *skf* 和 *sdp* 基因对重组细胞的催化活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:表 1 为本实验所使用的菌株和质粒。

1.1.2 主要培养基:(1) LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母抽提物 5,NaCl 10,pH 7.5,琼脂粉 15(固体培养基),用于 *B. subtilis* 的一般培养。需要时加入氯霉素 6 mg/L,或新霉素 15 mg/L,或博来霉素 10 mg/L。(2) 发酵培养基(g/L):蛋白胨 32.00,酵母提取物 20.00,NaCl 5.00,NH₄Cl 2.00,ZnSO₄ 0.10,KH₂PO₄ 6.00,Na₂HPO₄ 12.00,CaCl₂ 0.06,pH 7.2,用于培养 *B. subtilis* 测定全细胞催化活性。

1.1.3 主要试剂:*Taq* 酶购自北京索莱宝科技有限公司;HifiDNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司;DNA 胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物有限公司;dNTPs、限制性内切酶和 cDNA 第一链扩增试剂盒购自 Thermo scientific 公司;细胞总 RNA 提取试剂盒购自天根

表 1. 实验所用的菌株和质粒

Table 1. The strains and plasmids used in the study

Strains and plasmids	Genotype	Source
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	stored in this lab
<i>B. subtilis</i> 168N	<i>trpC2, ΔaraR::P_{ara}-neo</i>	stored in this lab
<i>E. coli</i> top10	Host for plasmid construction	stored in this lab
<i>B. subtilis</i> WD-1	<i>trpC2, ΔsacB::P_{cdd}-acoR, ΔaraR::P_{ara}-neo</i>	this study
<i>B. subtilis</i> WD-2	<i>trpC2, ΔyolA::P_{cdd}-sigL, ΔaraR::P_{ara}-neo</i>	this study
<i>B. subtilis</i> WD-3	<i>trpC2, ΔyolA::P_{cdd}-sigL, ΔsacB::P_{cdd}-acoR, ΔaraR::P_{ara}-neo</i>	this study
pHP13	Cm ^r , Em ^r	stored in this lab
pUB110	Km ^r , Blm ^r	stored in this lab
pHCY	Cm ^r , Em ^r , <i>hyd::P_{aco}, adc::P_{AE}</i>	this study
pHCS	Cmr, Emr, <i>sdl::P_{aco}, adc::P_{AE}</i>	this study
pUCS	Blm ^r , Km ^r , <i>sdl::P_{aco}, adc::P_{AE}</i>	this study
<i>B. subtilis</i> LXZm	<i>trpC2, ΔaraR::P_{ara}-neo, ΔsacB::P_{cdd}-ribA-DN*⁻-cat-araR</i>	stored in this lab
<i>B. subtilis</i> WD-4	<i>trpC2, ΔaraR::P_{ara}-neo, Δsdp, ΔyolA::P_{cdd}-sigL, ΔsacB::P_{cdd}-acoR</i>	this study
<i>B. subtilis</i> WD-5	<i>trpC2, ΔaraR::P_{ara}-neo, Δsdp, Δskf, ΔyolA::P_{cdd}-sigL, ΔsacB::P_{cdd}-acoR</i>	this study

Cm^r: chloromycetin resistance; DN*: the fragment used for homologous recombination.

生化科技有限公司; D,L-对羟基苯海因购自中天化工有限公司; D-对羟基苯甘氨酸标准品和对二甲氨基苯甲醛购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司(TCI); 博来霉素购自天津博鑫生物科技有限公司; 羟基丁酮购自天津希恩思生化科技有限公司; 其余生化试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 常规 DNA 操作方法

所用 PCR 引物和所设计的 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶基因序列的合成, 及 DNA 测序都委托北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。表 2 为本实验所用的 PCR 引物。其余的 DNA 片段都来自 PCR 扩增, 或者重叠 PCR 的拼接^[16]。*B. subtilis* 感受态细胞的制备、DNA 片段或质粒的转化, 及转化子筛选均采用 Spizizen 方法。质粒提取采用 CTAB 法, 核酸的电泳, 蛋白质的聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)均参考《分子克隆实验指南》。

1.3 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶共表达质粒的构建方法

以质粒 pHP13 为载体构建共表达质粒: 将全合成的 D-海因酶基因和 N-氨甲酰水解酶基因通

过重叠 PCR 拼接为 1 个片段, 并在片段两端分别引入 *Hind* III 与 *Bam*H I 酶切位点。将质粒 pHP13 和拼接的基因片段分别用 *Hind* III 与 *Bam*H I 双酶切 4 h, 然后再将二者用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接 3 h; 取适量的连接产物转化 *E. coli* top10 感受态细胞, 通过蓝白筛选和氯霉素抗性筛选出转化子; 然后提取质粒, 通过酶切电泳、PCR 扩增和 DNA 测序, 验证重组质粒的正确性。

以质粒 pUB110 为载体构建共表达质粒: PCR 扩增得到含有 D-海因酶基因和 N-氨甲酰水解酶基因的 DNA 片段, PCR 扩增质粒 pUB110 由 *ori*⁺ 到部分 *ori*⁻ 共 3277 bp 的片段; 然后采用重叠 PCR 方法, 将上述 2 个 DNA 片段拼接为 1 个片段, 并在拼接片段的两端都加上 *Bam*H I 酶切位点; 然后将拼接片段用 *Bam*H I 酶切 4 h, 再用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接 3 h; 最后取适量连接产物转化 *B. subtilis* 168 感受态细胞, 用新霉素抗性筛选转化子。转化 168N 菌株, 用博来霉素抗性筛选转化子。由转化子中提取的质粒最终通过酶切电泳、PCR 扩增及测序验证。

表 2. 引物及合成序列
Table 2. Primers and synthetic sequences

Primers	Primer sequences (5'→3')
Paco1	TACCAAGGAGGAGTTATAGCGAACGGCACGATAGACTGTAT
Hyd1/Hyd2	ATCAATCACAATGGAGGACAA/CGGGATCCATCAATCACAATGGAGGACAA
acoR-U1/Cdd2	CTCCTCCAGCAAGATGATT/GTGTAATTCCTCCCTTACCT
acoR1	AGGTAAGGGAGGAATTTACACATGAACTCGGTGCCAAACG
acoR2	CTCATCGGTGTCTGTGTTAT
acoR-D1	ATAACACAGACACCGATGAGTTGATCCTAACGATGTAACC
acoR-G2	GGAGTCAGTGAACAGGTAC
sigL-U1	GGCAGTTACTTATTGGACAG
sigL1	AGGTAAGGGAGGAATTTACACATGGATATGAACTTCAGC
sigL2/sigL3	CTCTACTGAAAGTGTTCCTCA/TGGAAAACACTTTCAGTAGAG
sigL4	CATTATCACTCGGCATGGA
sigL-D1/G2	TCCATGCCGAGTGATAATGTTGGTGTCGTCTCAATCTT/TTGCTGAGTATTGTTCTGTC
RTcpA1/A2	ACGAGCATGTGGCGGAAT/GATAGCGACTGACGGTGT
PU7	TCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGAGTGCCGACCAAACCATAAAAC
PU8	CGGGATCCCAGCACAATTCCAAGAAAAACA
skf-U1/U3	CATTAGGCTGGAAGTCTGTA/AACAGCAGAGAAGTCACTCCATAAGTAAACCTCCTCT
skf-D1/D2	GAGTGACTTCTCTGCTGTT/ATGGGTGCTTTAGTTGAAGACACAGTCGGTTCGTCTAA
skf-G1/G2	CACGAAAACCTGAATGAATAAGAGATGAGTGCTGACCA/GCTCCACCACATCTGATAC
CR1/CR2	TCTTCAACTAAAGCACCCAT/TTATTCATTCAGTTTTTCGTG
sdp-U1	GCTTAGAGGAGGTAATCTACAT
sdp-U2S	CAGCCGCTTCTAAATCAGACTAACCAAGTGATGACAACA
sdp-D1S	TCTGATTTAGAAGCGGCTG
sdp-D2S	ATGGGTGCTTTAGTTGAAGACGATAACAATGGTCAGGAAAT
sdp-G1	CACGAAAACCTGAATGAATAAGGAGGTGAATCAGTCAAGTT
sdp-G2	CGCCACAACATATAAATATCC

1.4 基因的整合表达和敲除方法

采用无标记基因修饰方法^[17],对 *B. subtilis* 染色体上的基因进行修饰,包括基因的整合表达和敲除。选择在染色体 *sacB* 位点整合表达 *acoR* 基因,首先从 *B. subtilis* 168 染色体上 PCR 扩增 *acoR* 基因的编码序列 R 片段(2149 bp),再从 *B. subtilis* LXZm 菌株染色体上扩增含有上游同源臂 U 和 P_{cdd} 表达盒^[18]的 UP_{cdd} 片段(1311 bp),以及含有下游同源臂 G、正向选择标记盒 CR 和内部同源重组片段 D 的 DCRG 片段(3628 bp)。然后通过重叠 PCR 方法,拼接成 UP_{cdd} DCRG 片段。用

UP_{cdd} -DCRG 片段转化 *B. subtilis* 168N 感受态细胞,用氯霉素抗性平板筛选抗性菌落。抗性菌落转接 LB 培养基,37 °C、220 r/min 培养 4 h。培养液稀释后涂布新霉素抗性平板,用新霉素抗性反向选择“弹出”正向选择标记盒的转化子。最后,通过 PCR 扩增和 DNA 测序验证,得到 P_{cdd} -*acoR* 基因整合的重组菌株 WD-1。采用相同的方法,在 *B. subtilis* 168N 染色体 *yolA* 位点整合表达了 P_{cdd} -*sigL* 基因,构建了 WD-2;以及 P_{cdd} -*acoR* 和 P_{cdd} -*sigL* 基因共整合表达的重组菌 WD-3。采用相同的方法,在 *B. subtilis* WD-3 菌

株染色体上敲除了 *skf* 和 *sdp* 基因，构建了双缺陷菌株 WD-5。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

使用罗氏公司 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪，采用荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)方法，测定靶基因的胞内 mRNA 相对水平，用于表征靶基因的相对表达水平。使用 LB 培养基，37 °C、225 r/min 摇瓶培养待测菌株；在培养至 12、18 和 24 h 时，分别取样并提取细胞总 RNA 作为模板，进行 cDNA 第一链的扩增，然后进行 qRT-PCR 扩增测定 C_t 值。上述实验的条件及具体操作步骤，均按照所使用试剂盒的推荐条件进行。qRT-PCR 扩增的参比基因为 *B. subtilis* 的碳分解代谢全局调控蛋白 CcpA 编码基因 *ccpA*。分别测定对照菌和目标菌的靶基因及参比基因的 C_t 值，根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[19]，计算目标菌靶基因 mRNA 胞内水平相对于对照菌的倍数。

1.6 全细胞 D,L-对羟基苯海因催化活性的测定

待测菌株用 5 mL LB 培养基，225 r/min、37 °C 活化培养 12 h。按 2% 接种量转接 30 mL 发酵培养基，37 °C、225 r/min 振荡培养 6 h，加入终浓度为 0.5% 的羟基丁酮，继续诱导培养至 24 h。取 2 mL 发酵液离心收集菌体，用 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.0) 洗涤 2 遍，再用 10 mL 40 °C 预热的反应液 (0.3% D,L-对羟基苯海因的 Tris-HCl 缓冲液) 重悬，置 40 °C 水浴恒温箱中，160 r/min 振荡反应 30 min，加入 10 μ L 的 6 mol/L HCl 终止反应；反应液 13000 r/min 离心 1 min，取上清液作为分析样品。对 *B. subtilis* 168 菌株的培养物进行相同的处理及反应，所得反应液的上清液，作为随后分光光度法测定 D-HPG 的参比液。

采用 Agilent 1260 HPLC 定量测定反应液中

的 D,L-对羟基苯海因、D-HPG 和中间物 N-氨甲酰基-对羟基苯甘氨酸，色谱条件为：Poroshell 120 EC18-2.7 m (4.6 mm×50 mm) 色谱柱，流动相 $\phi(\text{CH}_3\text{CN})$ $\phi(\text{H}_2\text{O})=10$ 90(体积比)，进样量 1 μ L，流速 0.5 mL/min，紫外检测器波长 210 nm。

采用茚三酮法定量测定反应液中的 D-HPG：在试管中加入 0.9 mL 样品、0.1 mL 盐酸 (0.2 mol/L) 和 0.5 mL 的 0.2% 茚三酮溶液，混匀后静置 5 min；然后在 100 °C 水浴中反应 3 min；用分光光度计测量反应液在 570 nm 下的 OD 值，根据公式(1) 计算每毫升发酵液中收集的静息细胞所具有的催化活性。

催化活性单位(U/mL)=(OD₅₇₀+0.133)/2.35 公式(1)

1 个催化活性单位定义为：在 1 min 内水解 D,L-对羟基苯海因生成 1 μ mol 的 D-HPG 所需要的酶量。

采用对二甲氨基苯甲醛(PDAB)法，定性检测样品中的 N-氨甲酰基-D-对羟基苯甘氨酸。取 100 μ L 样品和 10% PDAB (6 mol/L HCl) 试剂 10 μ L，在 96 孔板中混匀，肉眼观测颜色变化。PDAB 试剂与 N-氨甲酰基-D-对羟基苯甘氨酸可在常温下发生反应，生成黄色物质，表明样品中含有 N-氨甲酰基-D-对羟基苯甘氨酸。

1.7 超声法细胞破碎方法

将待测菌株用发酵培养基培养，并加入羟基丁酮诱导 18 h 后，将培养液 4 °C、4000 r/min 离心 15 min，收集菌体沉淀，用磷酸盐缓冲液(PBS) 洗涤 2 遍；1 g 湿菌体用 20 mL PBS 缓冲液重悬，用超声破碎机破碎 30 min (400 W，运行 5 s、休息 5 s 工作模式)；将细胞裂解液 4 °C、4000 r/min 离心 15 min，收集上清液用于聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

1.8 活菌计数及芽孢计数方法

活菌计数采用平板计数法，即：每一稀释度做3个平板，37 °C 培养 14 h，进行菌落计数，单位为 CFU/mL。进行芽孢计数时，先将稀释好的菌悬液 80 °C 水浴 15 min，然后采用平板计数法计数。

2 结果和分析

2.1 D-海因酶与 N-氨甲酰水解酶的共表达

通过氨基酸序列比对，选择来自 *Bacillus stearothermophilus* SD-1 的 *sd1* 基因^[20]，以及 *Jannaschia* sp. CCS1 的 *hyd* 基因^[21]，作为在 *B. subtilis* 中进行异源表达的 D-海因酶基因。选择羟甲基酮诱导的 P_{aco} 表达盒^[22]，与 *sd1* 或 *hyd* 基因编码序列，以及 T7 终止子，分别拼接为 P_{aco} -*sd1* 和 P_{aco} -*hyd* 基因，并进行全序列合成。选择来自 *Agrobacterium* sp. KNK712 的 N-氨甲酰水解酶基

因 *adc* 的编码序列^[23]，与 P_{AE} 表达盒^[24]及噬菌体 *cryIAa* 终止子^[25]拼接为 P_{AE} -*adc* 基因，并进行全序列合成。将全合成的 P_{aco} -*sd1* 和 P_{aco} -*hyd* 基因，分别与 P_{AE} -*adc* 基因通过重叠 PCR 拼接为 *adc*-*sd1* 片段和 *adc*-*hyd* 片段，片段两端分别引入了酶切位点(图 2)。

以低拷贝的 *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭质粒 pHP13 作为载体，分别与 *adc*-*sd1* 和 *adc*-*hyd* 连接，构建 D-海因酶与 N-氨甲酰水解酶共表达质粒。经过在 *E. coli* top10 中的筛选和验证，得到了 *adc*-*sd1* 共表达质粒 pHCS，以及 *adc*-*hyd* 共表达质粒 pHCY。

将重组质粒 pHCY 和 pHCS 分别转化 *B. subtilis* 168 感受态细胞，筛选出 168/pHCY 和 168/pHCS 转化子。各选择 10 株转化子，进行摇瓶培养及测定全细胞的催化活性。所测定的全部转化子均能够催化 D,L-对羟基苯海因转化为 D-HPG (图 3)，而且反应液的定性测定显示没有反应中间物 N-氨甲酰基-D-对羟基苯甘氨酸的积累。

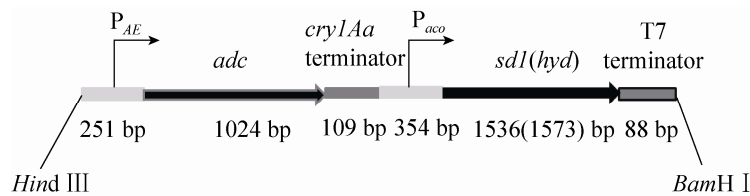


图 2. *adc*-*sd1*(*adc*-*hyd*)序列的构成

Figure 2. The composition of *adc*-*sd1*(*adc*-*hyd*) sequence.

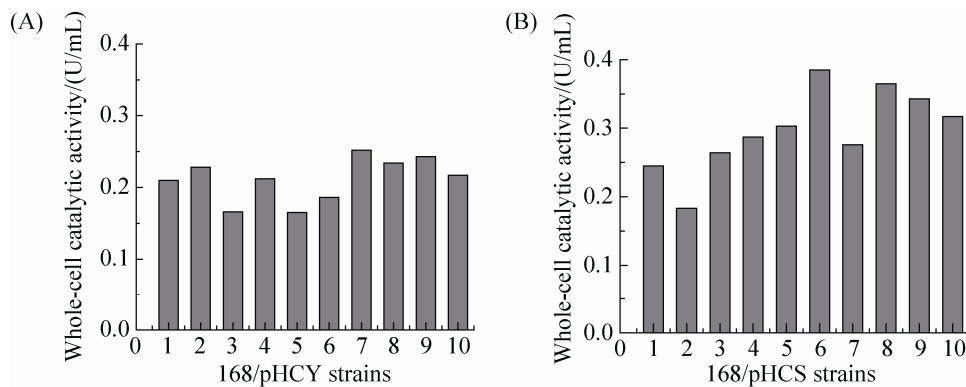


图 3. 不同重组菌株的全细胞催化活性比较

Figure 3. Comparison of whole-cell catalytic activity of the recombinants.

说明在 *B. subtilis* 中, 异源的 *sdI*、*hyd* 和 *adc* 基因, 能够被 P_{aco} 表达盒或 P_{AE} 表达盒正确表达, 并且表达产物具有正常的催化活性。由于 168/pHCY 菌株的平均催化活性为 0.21 U/mL, 168/pHCS 菌株的平均催化活性为 0.31 U/mL, 且 2 株菌的生物量均为 3.5×10^8 CFU/mL 左右, 表明 *B. stearothermophilus* SD-1 的 D-海因酶(*sdI* 基因)性能更好, 故选择 *adc-sdI* 基因及其表达质粒 pHCS 用于后续研究。

2.2 *acoR* 和 *sigL* 基因过表达对细胞催化活性的影响

P_{aco} 表达盒受 σ^L 识别, 转录需要羟基丁酮诱导, 并依赖激活蛋白 AcoR。由于 *sigL* 和 *acoR* 基因的表达受到严格调控^[26], 可能会限制多拷贝 P_{aco} 表达盒的转录效率。分别在 *B. subtilis* 168N 整合表达一个额外的 *acoR* 和 *sigL* 基因拷贝, 并在 *sigL* 基因编码序列中引入了 G573A 同义突变, 以消除其碳分解代谢物调控元件(cre-box)。经过筛选和验证, 分别得到 *acoR* 整合表达菌株 *B. subtilis* WD-1

和 *sigL* 整合表达菌株 WD-2, 以及 *sigL* 和 *acoR* 双整合表达菌株 WD-3。

采用 *qRT-PCR* 方法, 测定了 WD-3 菌株 *sigL* 和 *acoR* 基因 mRNA 的胞内相对水平。结果显示(表 3 和表 4), WD-3 菌株的 *sigL* 和 *acoR* 基因的胞内 mRNA 水平, 均显著高于对照菌 168N。从生长 12 h 到 24 h, mRNA 水平的差异倍数呈降低趋势, 表明野生型的 *sigL* 和 *acoR* 基因在稳定期才被充分表达。

将 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶共表达质粒 pHCS 分别转化 WD-1、WD-2 和 WD-3 菌株, 筛选出 WD-1/pHCS、WD-2/pHCS 和 WD-3/pHCS 菌株。以 *B. subtilis* 168N/pHCS 为对照, 进行摇瓶培养和全细胞催化活性测定。结果显示(图 4), 过表达 *sigL* 和 *acoR* 基因都能明显提高催化活性, 其中过表达 *sigL* 基因的效果相对显著; 二者共同过表达, 平均催化活性达到 0.56 U/mL, 比对照菌提高了 80%。因此, 为了维持多拷贝 P_{aco} 表达盒的正常转录效率, 必需提高 σ^L 和 AcoR 蛋白的胞内水平。

表 3. *acoR* 基因的 *qRT-PCR* 转录分析

Table 3. The transcription analysis of *acoR* using *qRT-PCR*

Cycle number	168N		ΔC_t	WD-3		ΔC_t	$\Delta \Delta C_t$	$2^{-\Delta \Delta C_t}$
	<i>ccpA</i>	<i>acoR</i>		<i>ccpA</i>	<i>acoR</i>			
C_{12} (mean)	35.95	39.89	3.94	34.29	28.94	-5.35	-9.29	626.0
C_{18} (mean)	31.23	33.17	1.94	33.20	28.36	-4.84	-6.70	110.0
C_{24} (mean)	34.04	36.40	2.36	30.22	29.48	-0.74	-3.10	8.6

表 4. *sigL* 基因的 *qRT-PCR* 转录分析

Table 4. The transcription analysis of *sigL* using *qRT-PCR*

Cycle number	168N		ΔC_t	WD-3		ΔC_t	$\Delta \Delta C_t$	$2^{-\Delta \Delta C_t}$
	<i>ccpA</i>	<i>sigL</i>		<i>ccpA</i>	<i>sigL</i>			
C_{12} (mean)	35.95	38.28	2.33	34.29	29.48	-4.81	-7.14	141
C_{18} (mean)	31.23	36.39	5.16	33.20	31.75	-1.45	-6.61	98
C_{24} (mean)	34.04	39.97	5.93	30.22	34.60	4.38	-1.55	3

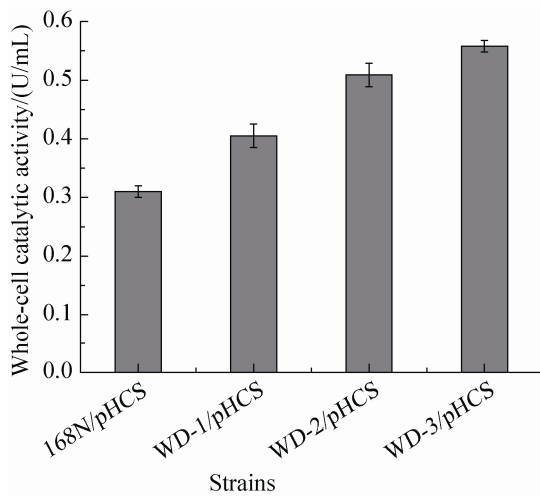


图 4. 过表达 *acoR* 和 *sigL* 基因对全细胞催化活性的影响

Figure 4. Effect of over-expressing *acoR* and *sigL* genes on whole-cell catalytic activity. Reactions were performed in triplicate, and error bars represent the standard errors of the means.

2.3 增加 *adc* 和 *sdI* 基因拷贝数对全细胞催化活性的影响

质粒 pUB110 在 *B. subtilis* 中有 30–50 个拷贝, PCR 扩增其部分片段^[27], 与 *adc-sdI* 片段拼接线性片段(图 5), 然后经酶切和连接反应环化, 并转化 *B. subtilis* 168, 经筛选和测序鉴定, 构建了高拷贝的 *adc-sdI* 基因共表达质粒 pUCS。

将重组质粒 pUCS 转化 *B. subtilis* WD-3 感受

态细胞, 经博来霉素抗性筛选、酶切电泳及测序验证, 得到了正确的 WD-3/pUCS 转化子。随机选择 10 株转化子测定其全细胞催化活性。结果显示(图 6), WD-3/pUCS 菌株的平均催化活性超过 1.0 U/mL, 最高达到 1.2 U/mL, 催化活性的平均值比 WD-3/pHCS 菌株提高了 78%。

为了直观比较菌株 WD-3/pUCS 和 WD-3/pHCS 的 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶胞内水平差异, 分别对其细胞裂解液的上清液进行了 SDS-PAGE 分析, 上样量均为 20 μ L。D-海因酶(Sd1)和 N-氨甲酰水解酶(Adc)亚基的理论分子量, 分别为 54 kDa 和 34 kDa。电泳结果显示(图 7), 在 WD-3/pUCS 和 WD-3/pHCS 菌株细胞裂解液的上清液中, 均能检出约 54 kDa 和 35 kDa 的蛋白条带, 而且它们的亮度呈现由 WD-3/pHCS 到 WD-3/pUCS 的明显递增趋势。而作为对照的 WD-3 菌株, 在相应位置没有明显条带。增加表达质粒的拷贝数, 能够显著增加 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶的表达量及全细胞的催化活性。

2.4 羟基丁酮诱导时间的优化

羟基丁酮对 P_{aco} 表达盒的诱导表达机制尚不明确。在此前的实验中, 诱导剂羟基丁酮在发酵培养基中的加入时间(发酵 6 h)、终浓度(0.5%)和

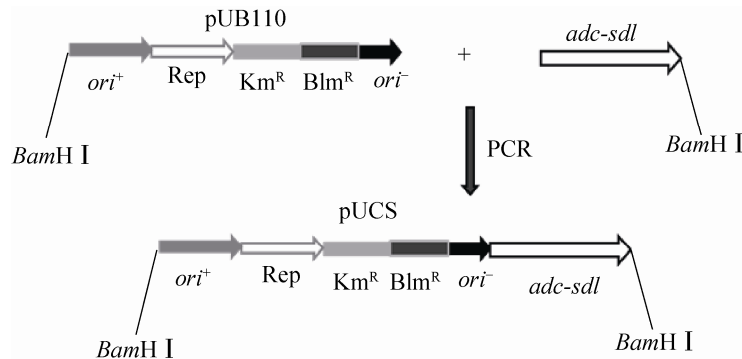


图 5. 重组质粒 pUCS 的构建

Figure 5. Construction of recombinant plasmid pUCS.

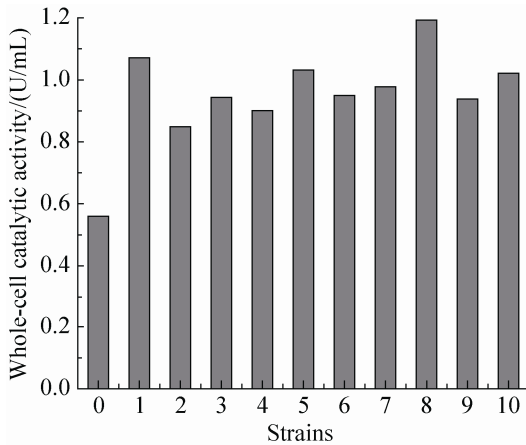


图 6. WD-3/pUCS 菌株的催化活性

Figure 6. Catalytic activity of WD-3/pUCS.

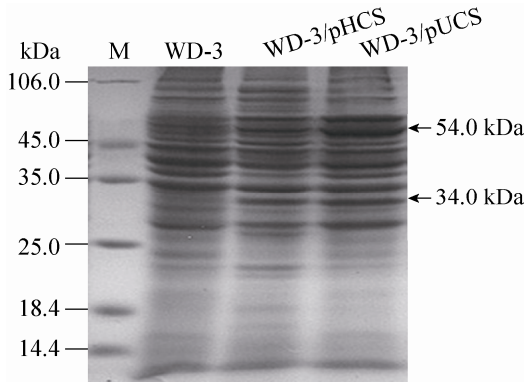


图 7. 重组菌细胞裂解液的 SDS-PAGE

Figure 7. SDS-PAGE of cell lysate of recombinants. M: protein marker.

诱导时间(18 h),均采用文献值^[22]。为了确定诱导时间的正确性,对 WD-3/pUCS 和 WD-3/pHCS 菌株分别进行了诱导时间为 8、12、16、18、20 和 22 h 的发酵培养。全细胞催化活性的测定结果显示(图 8),羟基丁酮诱导 18 h,细胞的催化活性最高,结果与文献值相符。

2.5 敲除 *sdp* 和 *skf* 基因对全细胞催化活性的影响

B. subtilis 在营养限制条件下会形成芽孢,在芽孢形成起始阶段,会出现芽孢形成细胞杀死非芽孢形成细胞的自相残杀(Cannibalism)行为。芽孢形成细胞分泌的毒素 SKF(*skfABCDEF* operon)

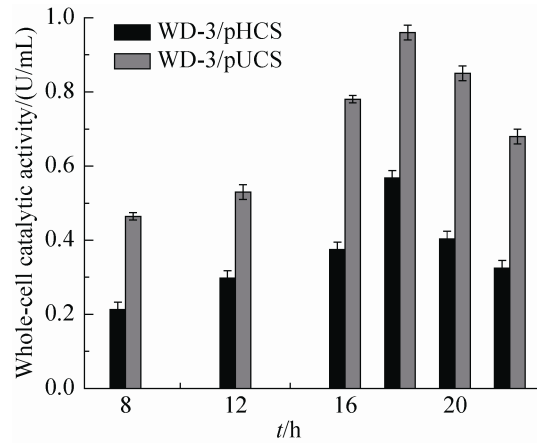


图 8. 羟基丁酮诱导时间与全细胞催化活性的关系

Figure 8. The relationship between induced time by acetoin and whole-cell catalytic activity. Reactions were performed in triplicate, and error bars represent the standard errors of the means.

和 SDP (*sdpABC* operon), 是杀死姊妹细胞的主要效应蛋白^[28]。

为了考察自相残杀行为对全细胞催化活性的影响,在 *B. subtilis* WD-3 中顺序敲除 *sdp* 和 *skf* 基因,构建了双缺陷株菌株 WD-5。转化表达质粒 pUCS, 筛选出 WD-5/pUCS 转化子。以菌株 WD-3/pUCS 为对照,通过摇瓶培养获得静息细胞。细胞被悬浮在 Tris-HCl 缓冲液中,置 40 °C 水浴中振荡孵育。分别测定细胞催化活性、活菌量和芽孢量随孵育时间的变化。结果显示(图 9-A), WD-3/pUCS 细胞的催化活性衰减较快,孵育 1.5 h 后,催化活性由 1.07 U/mL 下降为 0.24 U/mL,下降幅度为 78%;而 WD-5/pUCS 细胞相对衰减较慢,孵育 1.5 h 后,催化活性由 1.06 U/mL 下降为 0.48 U/mL,下降幅度为 49%。两株菌的初始活菌量约为 3.5×10^8 CFU/mL 左右,WD-5/pUCS 菌株的初始芽孢量为 3.1×10^5 CFU/mL,约高于 WD-3/pUCS 菌株一个数量级。细胞被孵育 1.5 h 后,二者的芽孢量均上升了一个数量级,而活菌

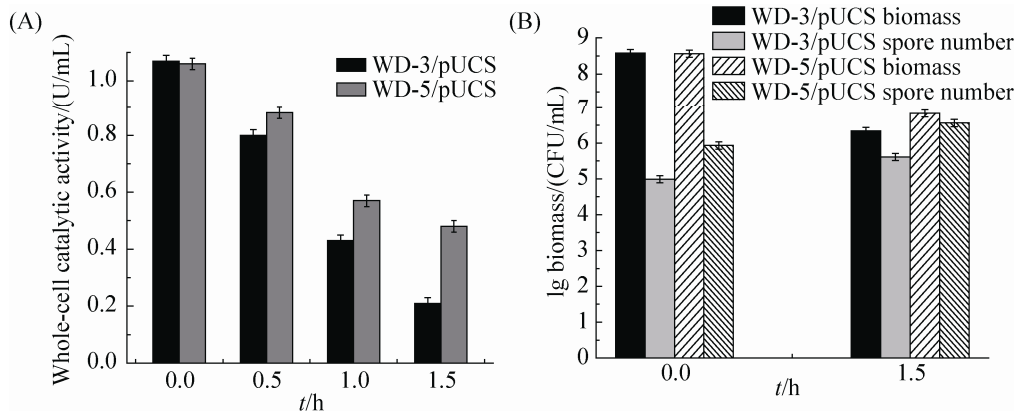


图 9. *skf* 和 *sdp* 双缺陷对催化活性和活菌及芽孢量的影响

Figure 9. Effect of deletion *skf* and *sdp* genes on catalytic activity, viable count and spore number. A: catalytic activity. B: viable count and spore number; reactions were performed in triplicate, and error bars represent the standard errors of the means.

量分别下降为 7.6×10^6 CFU/mL 和 2.1×10^6 CFU/mL (图 9-B)。在孵育过程中,部分细胞可能丧失了繁殖能力,而不能用平板菌落计数法检测,表现为活菌量的显著下降。

3 讨论

通过构建表达质粒,在 *B. subtilis* 中成功地表达了有催化活性的异源 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶。在使用高拷贝表达质粒的条件下,重组全细胞的催化活性在 1.0 U/mL 左右,接近重组 *E. coli* 的水平^[13],超过重组 *R. pickettii* 菌株的活性水平^[14]。因此,*B. subtilis* 重组细胞完全可以替代 *E. coli*,作为海因酶法生产 D-HPG 的全细胞催化剂,同时可以避免 *E. coli* 的不足。来自 *B. stearothermophilus* SD-1 的 D-海因酶,具有较高的全细胞催化活性。D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶的酶学性能差异,对全细胞催化活性有重要影响。选择经过定向进化而性能优良的 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶进行共表达,一定会使重组 *B. subtilis* 全细胞催化活性达到更高水平。

选择 P_{aco} 表达盒诱导表达 D-海因酶,主要考

虑其低泄露性的特点。但是, P_{aco} 表达盒的表达依赖羟基丁酮诱导、AcoR 蛋白激活和 σ^L 因子识别,它们之间合适的定量关系难以确定。高拷贝的表达质粒 pUCS 仅比低拷贝的 pHCS 质粒增加了 1.5 倍的催化活性,原因很可能是有限的 AcoR 蛋白和 σ^L 因子胞内水平限制了多拷贝 P_{aco} 表达盒的充分表达。 P_{aco} 表达盒或许不是最合适的 D-海因酶表达元件,还有进一步改进的空间。

B. subtilis 的芽孢形成和伴随的自相残杀行为,都不利于合成 D-HPG 的催化反应。敲除 *skf* 和 *sdp* 基因能够显著降低催化活性的衰减速率,很可能是因阻断了自相残杀而减少了细胞裂解的效应。因此,在催化合成 D-HPG 的 *B. subtilis* 细胞中敲除 *skf* 和 *sdp* 基因是必要的。伴随 *skf* 和 *sdp* 基因双缺陷而出现的芽孢比例增加一个数量级的问题,可以通过敲除相关基因阻断芽孢的形成^[29]。完全阻断芽孢的形成,可能会进一步减缓细胞催化活性的衰退。

综上所述,重组 *B. subtilis* 的全细胞催化活性还有进一步提升的空间,催化活性的衰减速率还有进一步降低的必要性,重组 *B. subtilis* 用于海因酶法合成光学纯的 L-或 D-氨基酸,具有较大的潜力。

参考文献

- [1] Zhang CH, Zheng GX, Xu LC, Meng XQ. Development and application of D-p-hydroxyphenylglycine. *Shandong Chemical Industry*, 2013, 42(5): 54–59. (in Chinese)
张翠红, 郑庚修, 徐立臣, 孟宪强. D-对羟基苯甘氨酸研究进展及开发应用. *山东化工*, 2013, 42(5): 54–59.
- [2] Dong YL, Tan XG, Pan XW. Progress on production of D-p-hydroxyphenylglycine using hydantoinase. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2009, 31(3): 47–52. (in Chinese)
董妍玲, 谭新国, 潘学武. 海因酶法制备 D-对羟基苯甘氨酸的研究进展. *氨基酸和生物资源*, 2009, 31(3): 47–52.
- [3] Altenbuchner J, Siemann-Herzberg M, Syldatk C. Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(6): 559–563.
- [4] Aranaz I, Ramos V, De La Escalera S, Heras A. Co-immobilization of d-hydantoinase and d-carbamoylase on chitin: application to the synthesis of p-hydroxyphenylglycine. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2003, 21(6): 349–356.
- [5] Chen SY, Chien YW, Chao YP. *In vivo* immobilization of D-hydantoinase in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(1): 78–81.
- [6] Jiang M, Shang LA, Wei P, Yu RH, Shen N, Ouyang PK, Chang HN. Pilot-scale production of D-p-hydroxyphenylglycine from DL-5-p-hydroxyphenylhydantoin by *Burkholderia cepacia* JS-02. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(4): 407–412.
- [7] Wu S, Liu Y, Liu YB, Zhao GG, Wang JJ, Sun WR. Enzymatic production of D-p-hydroxyphenylglycine from DL-5-p-hydroxyphenylhydantoin by *Sinorhizobium morelens* S-5. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(4): 520–526.
- [8] Runser S, Chinski N, Ohleyer E. D-p-hydroxyphenylglycine production from DL-5-p-hydroxyphenylhydantoin by *Agrobacterium* sp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 33(4): 382–388.
- [9] Park JH, Kim GJ, Kim HS. Production of D-amino acid using whole cells of recombinant *Escherichia coli* with separately and coexpressed D-hydantoinase and N-carbamoylase. *Biotechnology Progress*, 2000, 16(4): 564–570.
- [10] Pietzsch M, Wiese A, Ragnitz K, Wilms B, Altenbuchner J, Mattes R, Syldatk C. Purification of recombinant hydantoinase and L-N-carbamoylase from *Arthrobacter aurescens* expressed in *Escherichia coli*: comparison of wild-type and genetically modified proteins. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 737(1/2): 179–186.
- [11] Martínez-Gómez AI, Martínez-Rodríguez S, Clemente-Jiménez JM, Pozo-Dengra J, Rodríguez-Vico F, Las Heras-Vázquez FJ. Recombinant polycistronic structure of hydantoinase process genes in *Escherichia coli* for the production of optically pure D-amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(5): 1525–1531.
- [12] Liu YQ, Li QJ, Hu XJ, Yang JC. Construction and co-expression of polycistronic plasmid encoding D-hydantoinase and D-carbamoylase for the production of D-amino acids. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42(7): 589–593.
- [13] Zhang JL, Cai Z. Efficient and cost-effective production of D-p-hydroxyphenylglycine by whole-cell bioconversion. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014, 19(1): 76–82.
- [14] Yu H, Yang S, Jiang W, Yang Y. Efficient biocatalytic production of D-4-hydroxyphenylglycine by whole cells of recombinant *Ralstonia pickettii*. *Folia Microbiologica*, 2009, 54(6): 509–515.
- [15] Kim GJ, Lee DE, Kim HS. Construction and evaluation of a novel bifunctional N-carbamoylase-D-hydantoinase fusion enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2133–2138.
- [16] Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, Cabello FC, Sutherland M, Ladisch S. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(2): e19.
- [17] Liu SH, Endo K, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N. Introduction of marker-free deletions in *Bacillus subtilis* using the *AraR* repressor and the *ara* promoter. *Microbiology*, 2008, 154(9): 2562–2570.
- [18] Song BH, Neuhaud J. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. *Molecular and General Genetics MGG*, 1989, 216(2/3): 462–468.
- [19] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [20] Cheon YH, Kim HS, Han KH, Abendroth J, Niefind K, Schomburg D, Wang JM, Kim Y. Crystal structure of D-hydantoinase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into the stereochemistry of enantioselectivity. *Biochemistry*, 2002, 41(30): 9410–9417.
- [21] Cai YH, Trodler P, Jiang SM, Zhang WW, Wu Y, Lu YH, Yang S, Jiang WH. Isolation and molecular characterization of a novel D-hydantoinase from *Jannaschia* sp. CCS1. *The FEBS Journal*, 2009, 276(13): 3575–3588.
- [22] Silbersack J, Jürgen B, Hecker M, Schneidinger B, Schmuck R, Schweder T. An acetoin-regulated expression system of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(4): 895–903.

- [23] Nakai T, Hasegawa T, Yamashita E, Yamamoto M, Kumasaka T, Ueki T, Nanba H, Ikenaka Y, Takahashi S, Sato M, Tsukihara T. Crystal structure of *N*-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure*, 2000, 8(7): 729–738.
- [24] Zhu H, Yang SM, Yuan ZM, Ban R. Metabolic and genetic factors affecting the productivity of pyrimidine nucleoside in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 54.
- [25] Ramírez-Prado JH, Martínez-Márquez EI, Olmedo-Alvarez G. *cryIAa* lacks stability elements at its 5'-UTR but integrity of its transcription terminator is critical to prevent decay of its transcript. *Current Microbiology*, 2006, 53(1): 23–29.
- [26] Ali NO, Bignon J, Rapoport G, Debarbouille M. Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by *sigma* L in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(8): 2497–2504.
- [27] Wu SC, Wong SL. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 1999, 72(3): 185–195.
- [28] Morales TGP, Ho TD, Liu WT, Dorrestein PC, Ellermeier CD. Production of the cannibalism toxin SDP is a multistep process that requires SdpA and SdpB. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(14): 3244–3251.
- [29] Higgins D, Dworkin J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(1): 131–148.

Construction of recombinant *Bacillus subtilis* by co-expression of heterologous D-hydantoinase and N-carbamoylase

Yameng Wang, Rui Ban^{*}, Lu Liu, Yu Shen

Key Laboratory of Systems Biotechnology, Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China

Abstract: [Objective] We aimed at co-expressing heterologous D-hydantoinase and N-carbamoylase in *Bacillus subtilis*, and evaluating the feasibility of producing D-p-hydroxyphenylglycine by the recombinant *B. subtilis* whole-cell catalysis. [Methods] The P_{aco} expression cassette was combined with the coding sequence of *hyd* or *sdl* gene as an artificial gene to express D-hydantoinase. The P_{AE} expression cassette was combined with the coding sequence of *adc* gene as an artificial gene to express N-carbamoylase. The D-hydantoinase and N-carbamoylase co-expression plasmids pHCS(*sdl+adc*) and pHCY(*hyd+adc*) were constructed, using plasmid pHP13 as carrier; the co-expression plasmids pUCS(*sdl+adc*) was constructed, using plasmid pUB110 as carrier. The additional copy of *acoR* and *sigL* gene was integrated at chromosome. The *skf* and *sdp* gene were knocked out in *B. subtilis*. All recombinant strains bearing co-expression plasmid were characterized by analyzing whole-cell catalysis activity. [Results] In the recombinant strains with plasmid pHCY and with pHCS, the whole-cell catalytic activity reached 0.21 U/mL and 0.31 U/mL, respectively. After the over-expression of *acoR*, *sigL*, and high-copy-number pUCS, the whole-cell catalytic activity reached 1.0 U/mL. [Conclusion] Overexpression of *acoR*, *sigL* and the deletion of *skf*, *sdp* genes had significant effects on the catalysis activity of recombinant whole-cell.

Keywords: *Bacillus subtilis*, D-hydantoinase, N-carbamoylase, whole-cell catalyst, D-p-hydroxyphenylglycine

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA02A701)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-87402179; E-mail: banrui@tju.edu.cn

Received: 13 April 2016; Revised: 30 May 2016; Published online: 3 June 2016