

高分子量腈水合酶在大肠杆菌中的表达策略及 重组菌的细胞催化

张晓欢 崔文璟 周哲敏*

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】实现红球菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 来源的高分子量腈水合酶 H-NHase 在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中过量表达, 以提高菌体总酶活, 缩短菌体发酵周期, 提高生产效率。【方法】将 H-NHase 中编码 α 亚基的基因 *nhhA* 和调控基因 *nhhG* 上游的核糖体结合位点 (Shine-Dalgarno sequence, SD) 替换成翻译起始强度更高的异源 SD, 同时优化各亚基之间间隔序列的长度, 并根据大肠杆菌密码子偏好性对目的基因进行优化。通过 *E. coli* 重组表达系统过表达优化后的腈水合酶基因。采用离子交换层析对 H-NHase 进行纯化, 并通过凝胶过滤层析确定重组酶的相对分子量。优化了全细胞催化条件, 并建立底物恒速流加的细胞催化工艺, 模拟了烟酰胺的生产工艺。【结果】H-NHase 在 *E. coli* 中实现了过量表达。重组蛋白粗酶液的活性为 85.5 ± 4.3 U/mg, 纯酶比活为 234.0 ± 11.7 U/mg, H-NHase 相对分子质量为 504.5 ± 9.8 kD。细胞催化最适 pH 为 7.5, 最适温度为 25°C , 底物浓度为 400 mmol/L。在此条件下, 重组菌细胞酶活为 256.0 ± 10.4 U/mL, 流加工艺最终的产物转化率可达 99.9%。【结论】重组 H-NHase 大肠杆菌细胞生长迅速, 发酵周期短, 应用此重组菌进行细胞催化可以提高酰胺类物质的生产效率, 具有潜在的工业价值。

关键词: 高分子量型腈水合酶, 密码子偏好性优化, SD 序列, 间隔序列, 重组表达, 细胞催化

Strategy of high molecular mass nitrile hydratase expression in *Escherichia coli* and the whole-cell catalysis by the recombinant strains

ZHANG Xiao-Huan CUI Wen-Jing ZHOU Zhe-Min*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology (Ministry of Education), School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To increase the activity of the whole-cells, reduce the fermentation period and improve production efficiency, high molecular mass nitrile hydratase (H-NHase) from *Rhodococcus*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31300087)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-510-85325210; E-mail: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

Received: November 13, 2015; Accepted: March 01, 2016; Published online (www.cnki.net): March 10, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31300087)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-510-85325210; E-mail: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-11-13; 接受日期: 2016-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-10

rhodochrous J1 was over-expressed in *Escherichia coli*. **[Methods]** The native SD sequence upstream of the α -subunit gene *nhhA* and the activator gene *nhhG* was substituted by a stronger SD sequence, and the length of the intergenic region between the two genes was optimized. In addition, the rare codons within the gene were optimized. The modified *nhhBAG* was over-produced in recombinant *E. coli* BL21(DE3). After purification by ion-exchange chromatography, the molecular mass for the recombinant enzyme was determined by Size-exclusion chromatography. The catalytic conditions were optimized, and the process of biosynthesis of nicotinamide was simulated with continuous substrate-flow. **[Results]** H-NHase was successfully over-expressed in *E. coli*. The activity in cell-free extracts and the specific activity of the purified enzyme were 85.5 ± 4.3 U/mg and 234.0 ± 11.7 U/mg by using 3-Cyanopyridine as substrate, respectively. The molecular mass for recombinant H-NHase was 504.5 ± 9.8 kD. The optimal catalysis pH, temperature, and substrate concentration using whole cells were 7.5, 25 °C, 400 mmol/L, respectively. The whole-cell activity was up to 256.0 ± 10.4 U/mL. Under this condition, the transformation ratio by whole-cell was 99.9%. **[Conclusion]** The recombinant *E. coli* grows fast with a shorter fermentation period. The production efficiency of amides using the recombinant strain would be increased, which exhibits potential value for industrial production.

Keywords: High molecular mass nitrile hydratase, Codon optimization, SD sequence, Intergenic region, Recombinant expression, Whole-cell catalysis

脞水合酶(Nitrile hydratase, 简称 NHase, EC 4.2.1.84)是一种将脞类物质水合转化为更有利用价值的酰胺类化合物的金属酶^[1], 在工业上主要用于丙烯酰胺和烟酰胺的生产^[2]。大部分 NHase 由 α 和 β 两个亚基构成, 一般以 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体形式存在, 亚基分子量均为 23 kD 左右^[3]。常见 NHase 大多数来源于红球菌属(*Rhodococcus*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)^[3]。另外, 在一些真核生物中也存在^[4-5]。NHase 活性中心含有不同的金属离子, 一般可分为铁型脞水合酶(Fe-NHase)和钴型脞水合酶(Co-NHase)。Fe-NHase 活性中心含有一个非血红素铁离子^[6], Co-NHase 含有非咕啉态钴离子^[1], 并且金属离子都位于 α 亚基保守序列-Cys-X-Leu-Cys(SO₂H)-Ser-Cys(SOH)上, 其中包含两个被氧化的半胱氨酸残基: 被深度氧化的硫酰基(-SO₂⁻)和被浅度氧化的亚硫酰基(-SO⁻)^[6-8]。另外, 近几年的研究还发现了一些比较特殊的 NHase, 其中含有 Cu²⁺ 或者 Zn²⁺^[9]。生物体内, NHase 通常与脞水解酶^[10]、酰胺酶^[6]这两种关键酶一起发挥作用进行脞类物质代谢。

在化学工业中, NHase 被应用于酰胺类物质, 如丙烯酰胺、尼克酰胺以及 5-氰基戊酰胺的生产已

有数十年^[2]。其中, 将表达 NHase 的细胞通过固定化来进行生物催化生产丙烯酰胺的实例尤为典型。工业用丙烯酰胺的生产菌株经历了三代, 第一代红球菌 *Rhodococcus* sp. N774^[11-12], 第二代为假单胞菌 *Pseudomonas chlororaphis* B23^[13-14], 玫瑰色红球菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 是第三代^[15-16]。在 *R. rhodochrous* J1 中同时存在两种不同类型的脞水合酶, 按其分子量分为高分子量脞水合酶(H-NHase)和低分子量脞水合酶(L-NHase)。基因 *nhhBAG* 编码的 H-NHase 以多聚体结构形式存在^[16]; 基因 *nhlBAE* 编码的 L-NHase 以 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体结构形式存在^[17]。

先前的研究表明, 虽然 *R. rhodochrous* J1 来源的 H-NHase 和 L-NHase 已分别实现在红球菌属 *Rhodococcus rhodochrous* ATCC12674^[18] 和 *Rhodococcus facians* DSM43985^[19] 的异源表达, 但是, 因为它们同属红球菌属表达系统, 因此, 有与 *R. rhodochrous* J1 相同的缺陷: 培养时间长, 表达量低^[20-21]。而相对红球菌属表达系统, 大肠杆菌表达系统具有明显的优势: 菌体生长速度快, 蛋白表达量高。目前, L-NHase 已在大肠杆菌表达系统中实现高效表达^[22], 但 H-NHase 在大肠杆菌中的表达量极低, 且粗酶液酶活仅为 3.47×10^{-3} U/mg^[23], 目

前尚无其在大肠杆菌中成功大量表达的报道。

本研究对编码 *R. rhodochrous* J1 来源的 H-NHase 基因 *nhhBAG* 非编码区中 SD 序列和间隔区的长度进行改造后, 并进一步根据大肠杆菌偏好性将密码子进行优化, 最终实现其在大肠杆菌表达系统中的高效表达。另外, 重组菌全细胞催化性质也体现了重组大肠杆菌巨大的生产潜力。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒: 目的基因 *nhhBrbsArbsG* 由生物工程(上海)股份有限公司化学合成, 表达载体 pET24a(+)及宿主菌 *E. coli* JM109、*E. coli* BL21(DE3)均为本实验室保存。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)表达培养基 2YT (g/L): 胰蛋白胨 16.0, 酵母提取物 10.0、NaCl 5.0。菌体浓度 OD_{600} 达到 1.0 左右时, 加入 0.1 g/L $CoCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 0.6 mmol/L IPTG。

1.1.3 主要试剂和仪器: 质粒小量提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; Protein marker (Low/Broad)、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; 测序由上海生物工程公司进行; 3-Cyanopyridine (3-氰基吡啶, 烟腈)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 尼克酰胺标准样品、标准蛋白质 Marker (MW-MARKER PROTEINS)购自日本和光纯药工业株式会社。

蛋白质电泳仪、核酸电泳仪及凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司; AKTA 快速纯化液相色谱系统、HiTrap Q HP 1 mL 蛋白纯化预装柱购自美国通用电气医疗集团; 高效液相色谱仪 HPLC、色谱柱 HITACHI LaChrom C₁₈ (250ÅCHI LaChrom, 5 μm) 购自日立(HITACHI)公司; UV-1800PC 型紫外可见分光光度计购自上海美谱达有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 表达载体 pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 的构建: 以 *R. rhodochrous* J1 来源的 H-NHase 基因 *nhhBAG* 序列(GenBank 登录号为 D67027.1)为模板, 如图 1 所示 编码 H-NHase 亚基 NhhA 的基因 *nhhA* 及调控基因 *nhhG* 上游原 SD 序列均被强的 SD 序列 AAGGA 代替, 并将基因 *nhhB* 和 *nhhA* 之间以及 *nhhA* 和 *nhhG* 之间的间隔序列调整为 GATATAGAT, 完成表达元件的优化, 构建目的基因 *nhhBrbsArbsG*。随后, 根据大肠杆菌密码子偏好性对基因 *nhhBrbsArbsG* 序列中含有的稀有密码子进行优化, 并在目的基因的 5'-和 3'-分别设计 *Nde* I 和 *EcoR* I 限制性内切酶位点。设计得到的目的基因由上海生物工程(上海)有限公司合成。将合成的目的序列经 *Nde* I/*EcoR* I 酶切后插入 pET24a(+)质粒, 构建重组表达载体 pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG*。表达载体 pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 转化至 *E. coli* BL21(DE3), 从含有卡那霉素(Kan, 50 μg/mL)的 2YT 抗性平板上挑取阳性重组子。培养后提取重组质粒经 *Nde* I/*EcoR* I 双酶切验证并进行测序鉴定后保存备用。

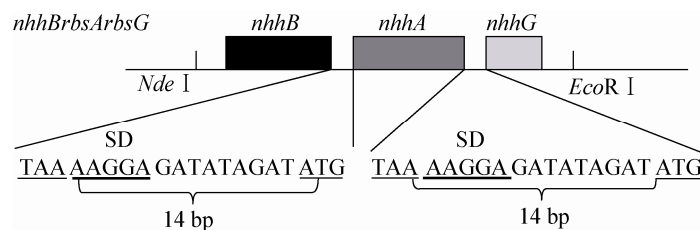


图 1 *nhhBrbsArbsG* 基因结构示意图

Figure 1 Genetic organization for the construction of *nhhBrbsArbsG*

注: 较细下划线处为终止密码子或起始密码子, 较粗下划线处为 SD 序列。

Note: Fine underlined for stop codon or initiation codon, coarse underlined for the SD sequence.

1.2.2 重组质粒在大肠杆菌表达系统中的表达:将重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 接种到 2YT 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 以 1% 接菌量转接至含有 30 mL 2YT 培养液的 250 mL 三角瓶中, 培养至 OD_{600} 约为 1.0, 加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 和 0.1 g/L 的 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 24 °C 诱导表达 18 h, SDS-PAGE 检测 H-NHase 的表达量, HPLC 检测酶活。

1.2.3 H-NHase 的纯化:用 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (Potassium phosphate buffer, KPB: 1.83% K_2HPO_4 , 0.27% KH_2PO_4 , pH 7.5) 悬浮诱导表达后的菌体, 冰浴超声破碎菌体细胞 (功率 300 W, 破碎 2 s, 间歇 7 s, 破碎时间 30 min), 12 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清, 即粗酶液。粗酶液经硫酸铵盐析沉淀进行初步分离, 收集 40%–65% 之间的沉淀蛋白 10 mmol/L KPB 复溶于透析袋中, 在缓冲液 10 mmol/L KPB [含 0.5 mmol/L 二流苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT)] 中 4 °C 过夜透析。透析后的粗酶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取 4 mL 注入强阴离子交换层析柱 Hitrap Q HP 进行分离。目的蛋白通过高盐缓冲液 (10 mmol/L KPB+1 mol/L KCl, pH 7.5) 线性洗脱 (洗脱范围 0.2–0.6 mol/L KCl) 得到。收集到的目的蛋白经超滤离心脱盐浓缩后得到一定浓度的纯酶。此部分实验通过 AKTA pure 蛋白质快速纯化系统在 4 °C 进行^[24]。

1.2.4 重组蛋白 H-NHase 的分子量测定:利用凝胶过滤分子排阻层析 (Size-exclusion chromatography, SEC) 测定 H-NHase 的相对分子量。10 mmol/L KPB (含 0.15 mmol/L KCl, pH 7.5) 为缓冲液, 流速 0.5 mL/min。100 μL 标准蛋白质 Marker [MW-MARKER PROTEINS: (1) 谷氨酸脱氢酶 (酵母), 290 kD; (2) 乳酸脱氢酶 (猪心脏), 142 kD; (3) 烯醇化酶 (酵母), 67 kD; (4) 肌激酶 (酵母), 32 kD; (5) 细胞色素 C (马心脏), 12.4 kD] 在缓冲液的驱动下进入凝胶柱 Superdex 200 10/300, 根据蛋白分子量大小不同而依次流出。同样地, 100 μL

目的蛋白以相同的缓冲液及流速经过凝胶过滤层析柱, 通过对比待测样品和标准蛋白质 Marker 的出峰体积, 计算出目的蛋白分子量。

1.2.5 重组 H-NHase 的酶活测定:H-NHase 活性测定依据之前建立的方法^[21]进行。单位酶活力定义为: 25 °C 条件下单位毫克纯酶每分钟催化产生烟酰胺的量 (U/mg)。蛋白浓度由 Bradford 法测定。

将 10 μL 酶液或菌体细胞加入 90 μL 10 mmol/L 的磷酸缓冲液中, 400 μL 500 mmol/L 烟腈为底物, 25 °C 反应 10 min, 500 μL 乙腈终止反应。反应液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 载入 C_{18} 色谱柱进行 HPLC 分析, 流动相为乙腈水 (乙腈:水=1:2) 的混合溶液。

1.2.6 重组型基因工程菌全细胞催化条件的确定:为确定全细胞催化最适 pH, 用 0.5 mol/L 的 Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 配制成 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的磷酸缓冲液重悬细胞, 测定不同 pH 条件下重组菌细胞酶活, 分析不同 pH 条件下细胞酶活变化。为确定细胞催化最适反应温度, 分别将反应体系于 15、20、25、30、35、40 °C 金属浴测定酶活, 测定不同温度条件下细胞催化的酶活; 为确定重组菌细胞催化的最适底物浓度, 以 50、100、200、400、800 mmol/L 的烟腈为底物, 在 25 °C、pH 7.5 条件下分别测定细胞酶活, 测定不同底物浓度条件下细胞催化的酶活。

1.2.7 底物流加细胞催化工艺的建立:模拟烟酰胺的生产工艺, 设计底物烟腈流加工艺试验, 测定烟酰胺的积累量^[25], 考察在此工艺下的烟酰胺生物转化过程: 1 mol/L 的烟腈经蠕动泵以 1.0 mL/min 的流速加入 20 mL OD_{600} 为 5.0 的菌液中并不断搅拌, 每 10 min 取样并测定产物的积累量, 1 h 后停止流加。流加过程中, 体系温度维持在 20–25 °C 范围。

1.2.8 数据分析方法:使用 SPSS 19.0 软件对数据进行差异显著性分析, 并使用 Regression-Linearer 对各因子进行线性回归分析。试验均做 3 个平行。结果以“平均数 \pm 标准差”形式表示。文中涉及数据分析的图表中, 均已进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 重组载体 pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 在大肠杆菌中的表达

将重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 活化后,接种到 2YT 液体培养基培养至 OD_{600} 约为 1.0,加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 和 0.1 g/L 的 $CoCl_3 \cdot 6H_2O$ 于 24 °C 诱导表达 18 h,收集细胞冰浴破碎。如图 2 所示, α 亚基和 β 亚基均有与理论相对分子量(α : 22.7 kD; β : 26.3 kD)相对应的条带^[16]。破碎上清粗酶液的活性为 85.5 ± 4.3 U/mg^[23]。表明 H-NHase 通过改造已实现在大肠杆菌中的过量表达。

2.2 H-NHase 的分离纯化及其分子量的确定

重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 发酵培养后,收集菌体细胞后超声破碎。经硫酸铵盐析和强阴离子交换层析柱 Hitrap Q HP 纯化,超滤脱盐浓缩得到一定浓度 H-NHase 纯酶,如图 3 所示,重组 H-NHase 达到电泳纯。以烟脘为底物测得重组酶的比酶活为 234.0 ± 11.7 U/mg,与野生菌 *R. rhodochrous* J1 中 H-NHase 和在 *R. rhodochrous* ATCC12674 中重组表达的 H-NHase 的比酶活处同一水平^[16,26]。

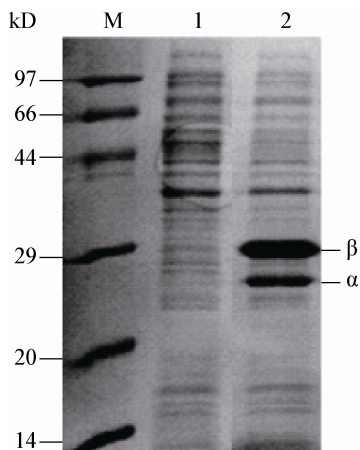


图 2 H-NHase 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达

Figure 2 Expressions of H-NHase in *E. coli* BL21(DE3)

注: M: Marker; 1: BL21(DE3)/pET24a(+)破碎上清; 2: BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 破碎上清。

Note: M: Marker; 1: Supernatants of BL21(DE3)/pET24a(+) expression after crushing as a comparison; 2: Supernatants of BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* expression after crushing.

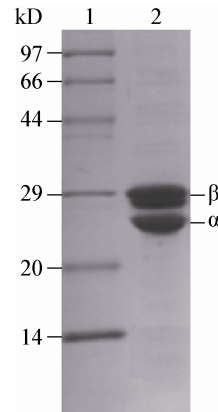


图 3 H-NHase 分离纯化电泳图

Figure 3 SDS-PAGE of the purified H-NHase

注: 1: Marker; 2: 高分子量型脘水合酶纯酶。

Note: 1: Marker; 2: Purified H-NHase.

通过 SEC 对重组 H-NHase 的分子量进行鉴定。标准蛋白 Marker 的分子量和洗脱体积分别为: (1) 谷氨酸脱氢酶(酵母), 290 kD, 11.17 mL; (2) 乳酸脱氢酶(猪心脏), 142 kD, 12.85 mL; (3) 烯醇化酶(酵母), 67 kD, 13.99 mL; (4) 肌激酶(酵母), 32 kD, 15.57 mL; (5) 细胞色素 C (马心脏), 12.4 kD, 17.17 mL。如图 4 所示,以洗脱体积与蛋白分子量的对数绘制标准曲线。随后, H-NHase 纯酶以相同缓冲液经凝胶过滤层析柱,洗脱体积为 10.55 mL,

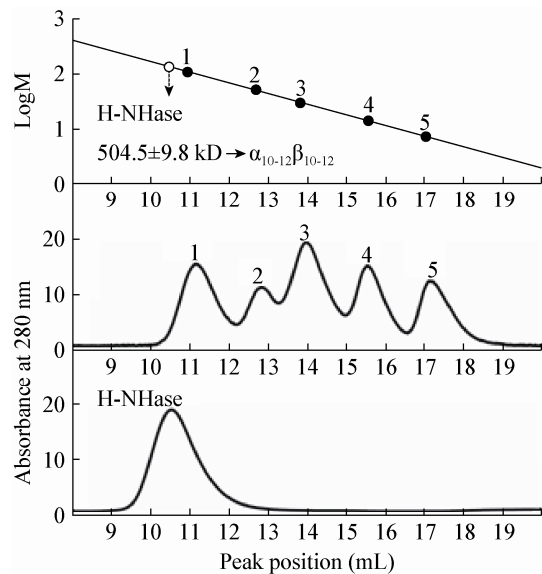


图 4 H-NHase 分子量测定

Figure 4 Molecular mass determination of H-NHase

对照标准曲线, 计算得出 H-NHase 的分子量为 504.5 ± 9.8 kD。进而, 依据 α , β 亚基理论分子量(α : 22.7 kD; β : 26.3 kD)^[16]推断出重组型 H-NHase 与野生型 H-NHase 聚体形式一致^[16]。

2.3 重组基因工程菌全细胞催化最适条件的确定

2.3.1 pH 对全细胞 NHase 的影响: 反应体系的 pH 对酶的活性通常有较大的影响, 不同来源的 NHase 有各自最适的 pH^[3]。为确定重组基因工程菌 *E. coli*-pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 全细胞催化烟腈的最适反应 pH, 选定 8 个不同 pH 条件的磷酸缓冲液 (pH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0) 进行实验。检测不同 pH 条件下重组菌 *E. coli*-pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 细胞酶活的变化, 结果表明, 在 pH 7.5 条件下细胞催化烟腈的酶活最高, 如图 5A 所示, 表明此 pH 值为最适 pH。

2.3.2 温度对全细胞 NHase 的影响: 酶在不同温度下进行酶促反应时, 其活性有显著差别。同样, 全细胞在不同反应温度下其活性也是不同的。为确定重组基因工程菌 *E. coli*-pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 细胞的最适反应温度, 分别测得不同温度下 (15、20、25、30、35、40 °C) 重组菌细胞酶活。如图 5B 所示, 随着反应温度的升高, 重组菌细胞酶活逐渐升高, 在 25 °C 时达到最大, 随后降低, 表明 25 °C 为细胞催化的最适温度。

2.3.3 底物浓度对全细胞 NHase 的影响: 在反应体系中, 当酶没有达到饱和时, 反应速率随底物浓度增大而增大, 饱和时则不变。相似地, 需要确定全细胞催化过程中酶活与底物浓度之间的关系。由图 5C 可知, 底物浓度小于 400 mmol/L 时, 细胞酶活随底物浓度的增加而升高, 在 400 mmol/L 时达到最大, 之后保持相对稳定。

2.4 生物法合成烟酰胺的流加工艺

重组基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 在最适反应条件 (pH 7.5, 25 °C, 400 mmol/L 烟腈为底物) 下酶活达 256.0 ± 10.4 U/mL (图 5)。基于此最适条件, 通过使用底物恒速流加的方法模拟了烟酰胺的生产工艺。如图 6 所示,

1 mol/L 的烟腈作为底物, 以 1 mL/min 的流速向重组菌液中流加, 随着底物的消耗, 产物也不断积累, 在 1 h 时停止流加, 90% 以上底物被重组菌细胞水合生成相应的烟酰胺, 只有少量剩余。停止流加后 10 min, 剩余底物完全转化为烟酰胺。烟酰胺的终浓度达到 748.8 ± 2.4 mmol/L, 底物转化率为 99.9%。结果表明, 采用底物恒速流加策略可以提高烟酰胺的最终产量, 有利于后期产物的提取。

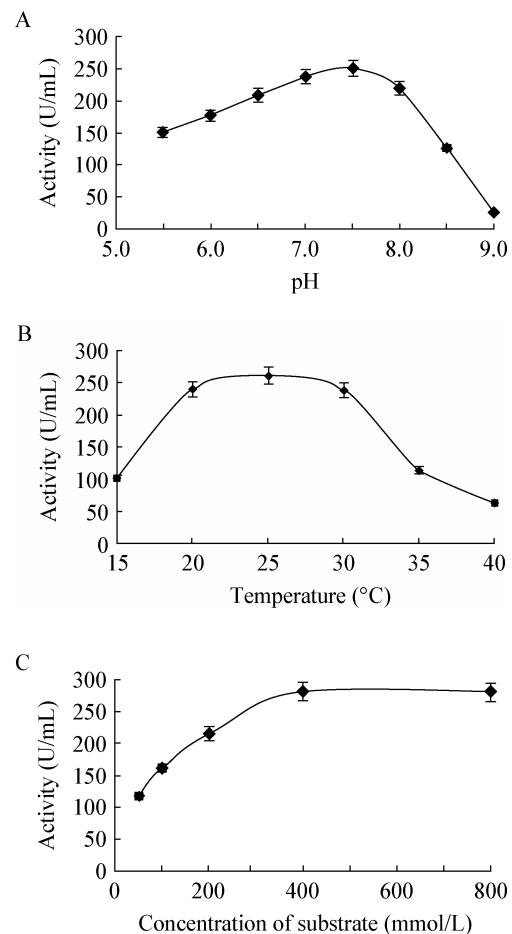


图 5 重组菌全细胞催化条件优化

Figure 5 Optimal condition for the whole-cell catalysis of recombinant strains *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG*

注: A: pH 对重组菌细胞酶活的影响; B: 温度对重组菌细胞酶活的影响; C: 底物浓度对重组菌细胞酶活的影响。

Note: A: Effect of pH on the activity of the recombinant strains; B: Effect of temperature on the activity of the recombinant strains; C: Effect of substrate concentration on the activity of the recombinant strains.

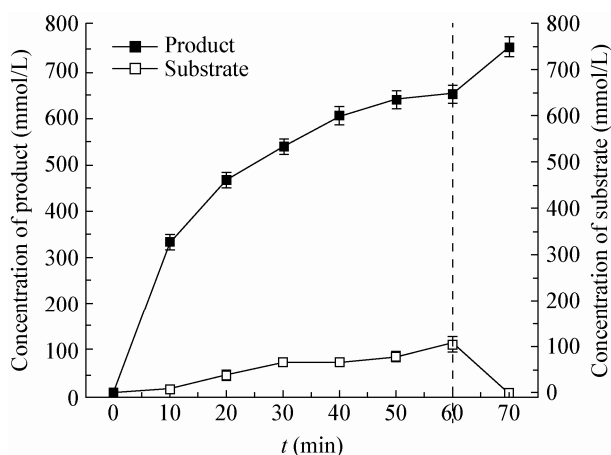


图6 细胞催化烟脞水合生成烟酰胺

Figure 6 Hydration reaction of 3-Cyanopyridine to nicotinamide catalyzed by the whole-cell

注: 随着烟脞的流加, 产物的量不断积累。—■—: 重组大肠杆菌流加反应体系中产物烟酰胺的生成量 (mmol/L); —□—: 对应的底物烟脞的剩余量 (mmol/L); ---: 1 h 时停止流加。重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 体系中产物烟酰胺的浓度在 1 h 内从 0 增加到 650 mmol/L 左右, 70 min 时剩余底物完全转化。实验进行 3 次重复。

Note: The product nicotinamide accumulated gradually, when immersed in dynamically increased concentrations of 3-Cyanopyridine. —■— for the concentration of nicotinamide in the feeding system including the recombinant strains *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG*, —□— for the concentration of the corresponding residual 3-Cyanopyridine, --- for the stop of the feeding at 1 h. The concentration of nicotinamide in the system including the recombinant strains *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* increased from 0 to about 650 mmol/L, and the residual substrate was all biocatalyzed. The experiments were performed in triplicate.

3 讨论

本研究从重组蛋白表达量、重组酶活性及其蛋白质分子量这三个方面, 探讨了重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 异源表达高分子量型脞水合酶 H-NHase 的酶学性质和催化能力, 基于此建立了底物恒速流加的全细胞生物催化方法, 高效地转化底物烟脞生产烟酰胺。之前 Kobayashi 等^[23]虽尝试将 *R. rhodochrous* J1 来源的两种脞水合酶 H-NHase 和 L-NHase 在 *Escherichia coli* 中表达, 但表达量均不高, 酶活极低^[23]。本研究中, 我们对野生型 *nhhBAG* 基因的表达元件进行了三方面的改造。(1) 我们对各亚基上游的 SD 序列进行优化。将原始序列替换成大肠杆菌最偏好的 SD 序列 AAGGA, 与原核生

物中 16S rRNA 基因的-3'端的嘌呤互补, 进而增强蛋白质的翻译起始效率^[27]。(2) 对各亚基之间间隔序列的长度进行优化。起始密码子 AUG 到 SD 序列的距离强烈影响翻译起始的效率^[28-29]。其距离不同, 所产生的调控翻译起始的水平也各不相同, 我们在本实验中将原始序列替换成了常见的 9 bp 间隔序列 GATATAGAT。(3) 将表达元件优化后的基因 *nhhBrbsArbsG* 进行大肠杆菌密码子偏好性优化。大肠杆菌的密码子使用具有简并性, 即一个氨基酸可由两个以上的密码子编码。但是, 大肠杆菌并不是同等地使用每个密码子来编码氨基酸。对某一个氨基酸而言, 大肠杆菌通常倾向于使用它所对应的同义密码子中的一种或数种, 而不是均衡地或随机地使用每一种同义密码子来编码它, 即大肠杆菌的密码子使用具有偏好性^[30-32]。通过这三方面的改造, 我们实现了红球菌 *R. rhodochrous* J1 来源的 H-NHase 在大肠杆菌中的过量表达。另外, 相对红球菌中 H-NHase 繁琐的纯化步骤^[18], 重组大肠杆菌中 H-NHase 的纯化方法实现了很大程度上的简化。H-NHase 重组酶的活性、分子量大小以及蛋白质四级结构缔合方式等酶学性质与野生酶一致, 表明 H-NHase 在大肠杆菌实现了高水平、高质量表达。本研究为脞水合酶基因工程改造及进一步提高脞水合酶在大肠杆菌中的表达水平奠定了基础, 同时也为一些异源重组表达效果不好的多亚基蛋白质的高效表达奠定了一定的实践基础。

红球菌重组基因表达系统完成一个发酵周期至少需要 90 h^[20-21]。相比之下, 利用重组表达系统完成发酵培养只需 20 h, 大大缩短了发酵周期。这一研究解决了野生型产脞水合酶的红球菌 *R. rhodochrous* J1 培养时间长、表达量低等问题。在大规模发酵生产脞水合酶中可以显著降低发酵成本, 同时重组菌高效的底物生物转化效率也体现了重组大肠杆菌巨大的生产潜力和更高的工业价值。

4 结论

本研究实现了红球菌 *R. rhodochrous* J1 来源的高分子量型脞水合酶 H-NHase 在重组型基因工程

菌 *E. coli* BL21(DE3)的过量表达。通过离子交换层析完成 H-NHase 的纯化,比酶活为 234.0 ± 11.7 U/mg, 相对分子质量为 504.5 ± 9.8 kD ($\alpha_{10-12}\beta_{10-12}$)。另外,重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*nhhBrbsArbsG* 全细胞催化条件 pH 7.5, 25 °C, 400 mmol/L 烟腈为底物,重组菌细胞酶活 256.0 ± 10.4 U/mL。重组菌进行全细胞催化,在模拟底物流加工艺中,底物的转化率达 99.9%。

参 考 文 献

- [1] Kobayashi M, Shimizu S. Cobalt proteins[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 261(1): 1-9
- [2] Yamada H, Kobayashi M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60(9): 1391-1400
- [3] Prasad S, Bhalla TC. Nitrile hydratases (NHases): at the interface of academia and industry[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 725-741
- [4] Foerstner KU, Doerks T, Muller J, et al. A nitrile hydratase in the eukaryote *Monosiga Brevicollis*[J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3976
- [5] Marron AO, Akam M, Walker G. Nitrile hydratase genes are present in multiple eukaryotic supergroups[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e32867
- [6] Noguchi T, Nojiri M, Takei KI, et al. Protonation structures of Cys-Sulfenic and Cys-Sulfenic acids in the photosensitive nitrile hydratase revealed by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(40): 11642-11650
- [7] Nagashima S, Nakasako M, Dohmae N, et al. Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1998, 5(5): 347-351
- [8] Murakami T, Nojiri M, Nakayama H, et al. Post-translational modification is essential for catalytic activity of nitrile hydratase[J]. *Protein Science*, 2000, 9(5): 1024-1030
- [9] Okamoto S, Eltis LD. Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. RHA1[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(3): 828-838
- [10] Kobayashi M, Fujiwara Y, Goda M, et al. Identification of active sites in amidase evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(22): 11986-11991
- [11] Watanabe I, Satoh Y, Enomoto K. Screening, isolation and taxonomical properties of microorganisms having acrylonitrile-hydrating activity[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, 51(12): 3193-3199
- [12] Watanabe I, Satoh Y, Enomoto K, et al. Optimal conditions for cultivation of *Rhodococcus* sp. N-774 and for conversion of acrylonitrile to acrylamide by resting cells[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, 51(12): 3201-3206
- [13] Nagasawa T, Yamada H. Microbial transformations of nitriles[J]. *Trends in Biotechnology*, 1989, 7(6): 153-158
- [14] Nagasawa T, Ryuno K, Yamada H. Superiority of *Pseudomonas chlororaphis* B23 nitrile hydratase as a catalyst for the enzymatic production of acrylamide[J]. *Experientia*, 1989, 45(11/12): 1066-1070
- [15] Nagasawa T, Takeuchi K, Yamada H. Occurrence of a cobalt-induced and cobalt-containing nitrile hydratase in *Rhodococcus rhodochrous* J1[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, 155(2): 1008-1016
- [16] Nagasawa T, Takeuchi K, Yamada H. Characterization of a new cobalt-containing nitrile hydratase purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 196(3): 581-589
- [17] Wieser M, Takeuchi K, Wada Y, et al. Low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1: purification, substrate specificity and comparison with the analogous high-molecular-mass enzyme[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 169(1): 17-22
- [18] Komeda H, Kobayashi M, Shimizu S. Characterization of the gene cluster of high-molecular-mass nitrile hydratase (H-NHase) induced by its reaction product in *Rhodococcus rhodochrous* J1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(9): 4267-4272
- [19] Zhou ZM, Hashimoto Y, Kobayashi M. Self-subunit swapping chaperone needed for the maturation of multimeric metalloenzyme nitrile hydratase by a subunit exchange mechanism also carries out the oxidation of the metal ligand cysteine residues and insertion of cobalt[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(22): 14930-14938
- [20] Nagasawa T, Takeuchi K, Nardi-Dei V, et al. Optimum culture conditions for the production of cobalt-containing nitrile hydratase by *Rhodococcus rhodochrous* J1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 34(6): 783-788
- [21] Zhou ZM, Hashimoto Y, Shiraki K, et al. Discovery of posttranslational maturation by self-subunit swapping[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(39): 14849-14854
- [22] Yu YC, Cui WJ, Liu Y, et al. Strategy for over-expression of nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 in *Escherichia coli*[J]. *Industrial Microbiology*, 2014, 44(2): 14-19 (in Chinese)
余越春, 崔文璟, 刘义, 等. *Rhodococcus rhodochrous* J1 腈水合酶在大肠杆菌中的表达策略[J]. *工业微生物*, 2014, 44(2): 14-19
- [23] Kobayashi M, Nishiyama M, Nagasawa T, et al. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from *Rhodococcus rhodochrous* J1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1991, 1129(1): 23-33
- [24] Cui YT, Cui WJ, Liu ZM, et al. Improvement of stability of nitrile hydratase via protein fragment swapping[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 450(1): 401-408
- [25] Tian Y, Chen J, Yu H, et al. Overproduction of the *Escherichia coli* chaperones GroEL-GroES in *Rhodococcus ruber* improves the activity and stability of cell catalysts harboring a nitrile hydratase[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2016, 26(2): 337-346
- [26] Zhou ZM, Hashimoto Y, Cui TW, et al. Unique biogenesis of high-molecular mass multimeric metalloenzyme nitrile hydratase: intermediates and a proposed mechanism for self-subunit swapping maturation[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(44): 9638-9648
- [27] Mironova RS, Xu J, AbouHaidar MG, et al. Efficiency of a novel non-shine-dalgarno and a shine-dalgarno consensus sequence to initiate translation in *Escherichia coli* of genes with different downstream box composition[J]. *Microbiological Research*, 1999, 154(1): 35-41
- [28] Steitz JA, Jakes K. How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975, 72(12): 4734-4738
- [29] Chen HY, Bjercknes M, Kumar R, et al. Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(23): 4953-4957
- [30] Bulmer M. The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage[J]. *Genetics*, 1991, 129(3): 897-907
- [31] Sakai H, Imamura C, Osada Y, et al. Correlation between Shine-Dalgarno sequence conservation and codon usage of bacterial genes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2001, 52(2): 164-170
- [32] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression[J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(7): 346-353