工业生物技术・

# 朱砂精酸生物合成体系的构建和应用

胡娟1,张东洋1,石柳柳1,赵小英1,李心利1,2\*

1 湖北医药学院 基础医学院, 湖北 十堰 442000

2 武当特色中药研究湖北省重点实验室,湖北 十堰 442000

胡娟,张东洋,石柳柳,赵小英,李心利. 朱砂精酸生物合成体系的构建和应用[J]. 生物工程学报,2025,41(5):2038-2049. HU Juan, ZHANG Dongyang, SHI Liuliu, ZHAO Xiaoying, LI Xinli. Construction and application of the cinnabarinic acid biosynthetic system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 2038-2049.

摘 要:朱砂精酸(cinnabarinic acid, CA)是一种广泛用于印染、化工和制药等行业的高值含氮三杂 环吩恶嗪酮类化合物,但至今尚未建立有效的 CA 合成体系。为实现 CA 的高效合成,本研究构建 了基于体外酶学催化和全细胞催化的 CA 生物合成体系。首先,针对 CA 合成的关键限制因素,筛 选到了一个可加速将 3-羟基邻氨基苯甲酸转化为 CA 的超氧化物歧化酶 SodA<sub>Pm</sub>。随后,通过对 SodA<sub>Pm</sub> 催化条件的优化,于体外实现了高达(176.6±14.3) mg/L 的 CA 合成。此后,基于 SodA<sub>Pm</sub> 酶,构建了用于 CA 合成的全细胞催化体系 BL-sodA<sub>Pm</sub>。最后,通过对全细胞催化系统 BL-sodA<sub>Pm</sub> 催化条件的优化,最终实现了高达 312.3 mg/L 的 CA 合成。本研究为未来 CA 及其衍生物的高效合 成与应用奠定了研究基础。

关键词:朱砂精酸;超氧化物歧化酶;全细胞生物催化; 3-羟基邻氨基苯甲酸

资助项目:湖北省自然科学基金(2024AFB228, 2022CFB933, 2022CFB934);湖北省教育厅自然科学基金(Q20232108);湖 北医药学院人才启动金(2022QDJZR009);武当特色中药研究湖北省重点实验室(湖北医药学院)开放课题(WDCM2023006); 国家大学生创新创业训练计划(X202410929045)

This work was supported by the Hubei Provincial Natural Science Foundation (2024AFB228, 2022CFB933, 2022CFB934), the Natural Science Foundation of Hubei Provincial Department of Education (Q20232108), the Faculty Development Grants from Hubei University of Medicine (2022QDJZR009), the Open Project of Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research (Hubei University of Medicine) (WDCM2023006), and the National Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (X202410929045).

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: lixinli\_20220542@hbmu.edu.cn

Received: 2024-10-28; Accepted: 2024-12-18; Published online: 2024-12-19

# **Construction and application of the cinnabarinic acid biosynthetic system**

#### HU Juan<sup>1</sup>, ZHANG Dongyang<sup>1</sup>, SHI Liuliu<sup>1</sup>, ZHAO Xiaoying<sup>1</sup>, LI Xinli<sup>1,2\*</sup>

1 School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China 2 Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Shiyan 442000, Hubei, China

**Abstract:** Cinnabarinic acid (CA) is a high-value nitrogen-containing tricyclic phenoxazinone widely used in dyeing, chemical, and pharmaceutical industries. However, the efficient CA synthetic system for large-scale CA production has not been constructed until now. To achieve efficient CA biosynthesis, we constructed an *in vitro* enzymatic synthetic system and a whole-cell biocatalytic platform for CA biosynthesis in this study. Firstly, targeting the main limiting factor of the CA synthesis, we identified a superoxide dismutase SodA<sub>Prm</sub> capable of efficiently converting 3-hydroxyanthranilate to CA. Subsequently, the *in vitro* catalytic parameters of SodA<sub>Prm</sub> were optimized, after which (176.6±14.3) mg/L CA was efficiently synthesized. Then, based on the selected SodA<sub>Prm</sub>, an *Escherichia coli* whole-cell catalytic system BL-sodA<sub>Prm</sub>. In summary, this study lays a profoundly foundation for the biosynthesis and application of CA and its derivatives in the future.

Keywords: cinnabarinic acid; superoxide dismutase; whole-cell biocatalysis; 3-hydroxyanthranilate

朱砂精酸(cinnabarinic acid, CA)是一种天 然的高值含氮三杂环吩恶嗪酮类色素化合物, 广泛用于印染、化工、化妆品和制药等行业[1-2]。 近年来研究发现,在脊椎动物体内,CA可以作 为代谢型谷氨酸受体 4 (metabotropic glutamate receptor 4, mGluR4)激动剂<sup>[3-4]</sup>、芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)配体<sup>[3,5]</sup>、吲哚胺 2,3-双加氧酶(indeleamine-2,3-dioxygenase, IDO)和 线粒体呼吸链的抑制剂<sup>[3,6]</sup>等参与到生物体炎 症发生、细胞凋亡和肝代谢等多重生理过程的 调控之中<sup>[3,7-8]</sup>。如 Hiramatsu 等<sup>[9]</sup>研究发现在细 胞内 CA 可通过诱导活性氧的产生而诱发胸腺 细胞的凋亡。Lowe 等<sup>[10]</sup>发现 CA 可作为炎症因 子 IL-22 释放的激动剂。与此同时,研究表明 CA亦具有良好的抗细菌、抗真菌、灭藻、抗疟 原虫以及免疫调节和抗癌等活性[2-3]。此外,动 物模型研究发现,CA 还具有潜在的镇痛以及神 经保护作用<sup>[3,11]</sup>。

目前, CA 合成主要有化学法和生物法<sup>[12-13]</sup>。 然而,相较于 CA 化学合成过程对苛刻反应条 件和催化剂的依赖性, 生物法则是一种更经济 和环境友好的 CA 替代合成方案。在生物体内 CA 可通过犬尿氨酸途径得以合成<sup>[3-4]</sup>。同时, 研究表明动物和人体、腐生白杆真菌属的朱红 秘孔菌(Pycnoporus cinnabarinus)、血红秘孔菌 (Pycnoporus sanguineus)、深红栓菌(Trametes coccinea)等以及家蚕(Bombyx mori)、枯叶蛱蝶 (Kallima inachus)和紫葳科植物(Tecoma stans) 等生物体均具有天然的 CA 合成能力<sup>[2-3,14-15]</sup>。 此后进一步研究发现,在拥有天然 CA 合成能 力的生物体内,尤其是脊椎动物体内,CA 主要 通过 2 分子犬尿氨酸途径中间代谢物----3-羟 基邻氨基苯甲酸(3-hydroxyanthrailate, 3-HA)的 缩合而得以积累<sup>[3,9]</sup>(图 1)。而漆酶(laccase)、超

氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过 氧化物酶 (peroxidase) 如辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)等均具有催化 CA 合成的能力<sup>[16-19]</sup>;然而,这些天然的 CA 生物 合成体系的 CA 合成能力均极其有限。为实现 更高效的 CA 合成,在 CA 天然合成菌株的基 础之上, Schinagl 等<sup>[20]</sup>通过 UV-A 辐照在朱红 秘孔菌(P. cinnabarinus)中实现了约 20 mg/g 细 胞干重(dry cell weight, DCW)的 CA 积累。Meng 等<sup>[21]</sup>通过培养基优化在 P. sanguineus SYBC-L7 内实现了对包含 CA 在内多种色素分子的高效 积累。近年来,合成生物学和系统代谢工程的 发展使得高效 CA 生物合成体系的构筑和应用 成为可能。Sharma 等<sup>[22]</sup>通过系统代谢工程和 模块化工程策略在大肠杆菌内实现了犬尿氨 酸途径的异源重构和CA类似物 Actinocin的从 头合成; Yue 等<sup>[12]</sup>借助代谢工程策略在绿针假 单胞菌(Pseudomonas chlororaphis) GP72 中实 现了 136.2 mg/L 的 CA 从头合成; 然而极低 的 CA 合成效率[27.2 mg/(L·d)]极大地削弱了将 P. chlororaphis GP72 进一步开发为 CA 高效合 成工厂的潜力。因此,开发高效的 CA 生物合

成系统是必要的。

在 CA 生物合成过程中<sup>[9,17]</sup>(图 1), 3-HA 首 先在氧气的作用下活化为 3-HA 羟基自由基并 生成超氧自由基(O2-) (反应 a)。随后 3-HA 羟 基自由基进一步与氧气反应生成活泼的醌亚胺 中间体和第2个O2<sup>-</sup>(反应b); 醌亚胺中间体随 之与 3-HA 发生缩合反应而生成 CA (反应 c)。 然而, Ishii 等<sup>[17]</sup>、Manthey 等<sup>[24]</sup>和 Liochev 等<sup>[25]</sup> 研究发现, 过量的 O2 积累能够可逆性地抑制 CA的持续合成,并证实超氧自由基 O2<sup>--</sup>的持续 积累是 CA 合成的主要限速因子, 而 O<sub>2</sub>-的消 除可极大地提升 CA 的合成效率。针对图 1 中 反应 d 所示的 O2<sup>--</sup>消除反应, 研究证明, Mn<sup>2+</sup> 依赖型超氧化物歧化酶 SOD 可通过快循环和 慢循环2种反应途径将O2-快速地歧化为O2和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>而实现对超氧自由基 O<sub>2</sub><sup>--</sup>的清除<sup>[23,26]</sup>。因 此, Mn<sup>2+</sup>依赖型 SOD 的引入或可极大地促进 CA 的合成。

为实现 CA 的绿色高效合成,依据前期研究结果,本研究构建了一套生物法 CA 合成方案。首先,通过筛选和表征不同来源的超氧化物歧化酶 SOD 后获得了一个可用于 CA 有效合



#### 图 1 CA 合成机理<sup>[9,17,23]</sup>

Figure 1 Synthetic mechanisms of CA<sup>[9,17,23]</sup>.

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

成的 SOD 酶 SodAprm; 通过对 SodAprm 酶体外 催化条件的优化实现了对 CA 的有效合成。随 后,基于 SodAprm,在大肠杆菌中构建了一套用 于 CA 合成的全细胞催化系统(whole cell catalytic system, WCCS) BL-sodA<sub>Prm</sub>。最终,通 过对全细胞催化系统 BL-sodApm 催化条件的优 化实现了对CA的高滴度和大尺度生物法合成。 本研究不仅为更高效的 CA 及其衍生物生物合 成平台的开发提供了理论支撑,也为未来 CA 的应用研究奠定了坚实的研究基础。

#### 材料与方法 1

#### 菌株、质粒和引物 1.1

大肠杆菌(Escherichia coli) TOP10 用于工 程质粒的构建; 全细胞催化体系在 E. coli BL21(DE3)中构建; 质粒 pET28a 用于不同来源 超氧化物歧化酶 SOD 的表达。本研究所用菌株 和质粒见表1。

#### 1.2 主要试剂

基因扩增采用 Phanta Flash Super-Fidelity DNA Polymerase (南京诺唯赞生物科技股份有 限公司)。菌落 PCR 采用 2×Taq Master Mix (南 京诺唯赞生物科技股份有限公司)。引物合成和

Table 1	Strains and p	lasmids used	in this study

表1 本研究所用菌株和质粒

质粒测序均由苏州金唯智生物科技有限公司完 成。3-HA、朱砂精酸、异丙基硫代-β-半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)和硫 酸卡那霉素均购自上海麦克林生化科技股份有 限公司。蛋白纯化用镍-NTA 琼脂糖凝胶购自北 京瑞达恒辉科技发展有限公司。BCA 蛋白定量 试剂盒和蛋白预染 marker 均购自南京诺唯赞生 物科技股份有限公司。实验用金属离子化合物 均购自上海笛柏生物科技有限公司。酵母和细 菌基因组提取试剂盒均购自北京索莱宝科技有 限公司。质粒的扩增、工程菌株的构建和工程 菌的大批量培养均采用 LB 培养基(10 g/L 蛋白 胨、10 g/L 氯化钠、5 g/L 酵母抽提物), LB 固 体培养基补加 2%的琼脂。另外根据实验需求补 加 50 mg/L 硫酸卡那霉素。

#### 1.3 方法

#### 1.3.1 质粒构建

利用基因组提取试剂盒分别提取酿酒酵母 BY4741α、大肠杆菌 BL21(DE3)和巨大普里斯特 氏菌(Priestia megaterium) HBM 的基因组。以提 取的基因组为模板,利用引物对 sodAS-F/ odAS-R、sodA-F/sodA-R 和 sodAB-F/sodAB-R 分别扩增不同宿主来源的 SOD 酶编码基因

Table 1 Strains and plasmids used in this study					
Name	Genotype	Source			
E. coli TOP10	$F^-$ mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\varphi$ 80 lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1	ToloBio			
	$araD139\Delta(ara-leu)7697 \ galU \ galK \ rpsL \ (Str^R) \ endA1 \ nup*G$				
E. coli BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdSB (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ) galdcm (DE3)	Lab storage			
Saccharomyces cerevisiae	MAT $\alpha$ , <i>his3</i> $\Delta$ 1, <i>leu2</i> $\Delta$ 0, <i>met15</i> $\Delta$ 0, <i>ura3</i> $\Delta$ 0	Lab storage			
ΒΥ4741α					
Priestia megaterium HBM		Lab storage			
BL-Con	E. coli BL21(DE3) containing plasmid pET28a, Kan <sup>R</sup>	This study			
BL-sodA <sub>Sce</sub>	E. coli BL21(DE3) containing plasmid pET-sodAsce, Kan <sup>R</sup>	This study			
$BL$ -sod $A_{Eco}$	E. coli BL21(DE3) containing plasmid pET-sodA <sub>Eco</sub> , Kan <sup>R</sup>	This study			
BL-sodA <sub>Prm</sub>	E. coli BL21(DE3) containing plasmid pET-sodA <sub>Prm</sub> , Kan <sup>R</sup>	This study			
pET28a	pBR322 origin, T7 promoter, T7 terminator, N-6×His, N-Thrombin, N-T7, Kan <sup>R</sup>	Novagen			
pET-sodAsce	pET28a containing gene <i>sodAsce</i> , Kan <sup>R</sup>	This study			
pET-sodA <sub>Eco</sub>	pET28a containing gene sodA <sub>Eco</sub> , Kan <sup>R</sup>	This study			
pET-sodA <sub>Prm</sub>	pET28a containing gene sodA <sub>Prm</sub> , Kan <sup>R</sup>	This study			

sodA<sub>sce</sub>、sodA<sub>Eco</sub>和 sodA<sub>Prm</sub>。以质粒 pET28a 为 模板,采用引物对 pET28-F/pET28-R 实现对 pET28a 载体的线性化,随后进行 *Dpn*I 消化。 扩增用引物序列见表 2。采用 DNA 胶回收试剂 盒[天根生化科技(北京)有限公司]对 DNA 扩增 产物进行纯化与回收。SOD 酶编码基因过表达 质粒的构建采用南京诺唯赞生物科技股份有限 公司一步克隆试剂盒。克隆质粒的转化采用 CaCl<sub>2</sub>诱导的化学转化法<sup>[27]</sup>。组装的质粒转入大 肠杆菌 TOP10 感受态中进行质粒的复制和扩 增;扩增质粒提取后进行基因测序验证。测序 正确的 pET-sodA<sub>sce</sub>、pET-sodA<sub>Eco</sub>和 pET-sodA<sub>Prm</sub> 分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中得到工 程菌株 BL-sodA<sub>sce</sub>, BL-sodA<sub>Eco</sub>和 BL-sodA<sub>Prm</sub>。质 粒 pET28a 导入 BL21(DE3)菌株中得到 BL-Con。

#### 1.3.2 蛋白表达与纯化

分别将工程菌株 BL-sodA<sub>Sce</sub>, BL-sodA<sub>Eco</sub> 和 BL-sodA<sub>Prm</sub>于 LB 平板划线并 37 ℃倒置过夜 培养。随后挑取单菌落接种于 3 mL LB 培养基 中(含 50 mg/L 硫酸卡那霉素),于 37 ℃、220 r/min 过夜培养。以 1%的接种量接种至含有 100 mL

表 2 本研究所用的引物

Table 2Primers used in this study

Primers	Sequences $(5' \rightarrow 3')$		
name			
sodAS-F	GTGGCAGCAGCCAACTCTCAGATCTTG		
	CCAGCATC		
sodAS-R	GGTGCCGCGCGGCAGCATGTTCGCGAA		
	AACAGCAG		
sodA-F	GTGGCAGCAGCCAACTCTTATTTTTCG		
	CCGCAAAAC		
sodA-R	GGTGCCGCGCGGCAGCATGAGCTATAC		
	CCTGCCATC		
sodAB-F	GTTACGACGCTGCAAAATAAGAGTTGG		
	CTGCTGCCAC		
sodAB-R	GGTGCCGCGCGGCAGCATGGCTTACAA		
	ATTACCAG		
pET28-F	GCTGCCGCGCGCGCACCAGG		
pET28-R	GAGTTGGCTGCTGCCACC		

LB 培养基(含 50 mg/L 硫酸卡那霉素)的锥形瓶 中于 37 ℃、220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub>=0.6; 随后 加入 0.1 mmol/L IPTG, 并于 24 °C、220 r/min 持续培养 18 h。培养结束后于 4 ℃、4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体以用于后期的蛋白纯化。 在蛋白纯化过程中,首先采用预冷的 25 mL Binding buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 10%甘油, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.9)重 悬收集的菌体,并于超声条件下(超声 20 min, 超声5s,停5s)进行细胞破碎处理。细胞破碎 结束后于4℃、4000 r/min 离心 30 min 收集上 清液。随后对收集的上清液进行蛋白纯化操作。 蛋白洗脱采用包含 500 mmol/L 咪唑的 Elution buffer 溶液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 10%甘油, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.9 )。 蛋白浓缩和缓冲液置换采用 15 mL 10 kDa 蛋白 超滤柱(Millipore 公司)。浓缩后的蛋白溶液保 存于 20%的甘油溶液中置于-80 ℃,或直接用 于后续的 SDS-PAGE 分析和 CA 合成实验。

#### 1.3.3 体外酶法合成 CA

SOD 酶的评估:不同来源 SOD 酶的催化 性能评估实验于 96 孔板中进行。100 µL 酶学反 应体系(0.1 mol/L HEPES, pH 7.4)中包含 1 mmol/L 3-HA 和 1 µmol/L SOD; 30 ℃孵育 15 min 后测定 450 nm 吸光值。以酶失活的反应 体系为对照。

缓冲液的评估:上述反应体系在不改变反 应组分和反应条件的情况下,将酶学反应的缓冲 液分别更换为 0.1 mol/L CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa (pH 4.4)、0.1 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.4)、 0.1 mol/L HEPES (pH 7.4)、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.4)和 0.1 mol/L Glycine-NaOH (pH 10.0)以 进行缓冲液的评估。

金属离子的评估:反应于 96 孔板中进行。 100 µL 酶学反应体系(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.4)中包含 1 mmol/L 3-HA、1 µmol/L SodA<sub>Prm</sub> 和 1 mmol/L 金属离子; 30 ℃孵育 15 min 后 测定 450 nm 吸光值以评估不同金属离子对 酶催化性能的影响。在此基础上,进一步评估不同金属离子组合对 SodAprm 酶催化性能的影响。

不同底物浓度和酶剂量对 CA 合成的影响 以及大尺度合成:反应于 96 孔板中进行,100 µL 酶学反应体系(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.4)中包 含指定浓度的 3-HA 或 SodA<sub>Prm</sub>、1 mmol/L Cu<sup>2+</sup> 和 1 mmol/L Mn<sup>2+</sup>;反应于 30 ℃下孵育 15 min 后测定 450 nm 吸光值。以此评估 1、3、5、7、 10 mmol/L 3-HA底物使用量对 CA 合成的影响。 随后在优化后的体系基础上进一步评估不同酶 量(0.5、1.5、3、5 µmol/L)对 CA 合成的影响。 基于最优催化条件,进一步尝试大体积 CA 合 成实验;反应体系为 1 mL。

#### 1.3.4 全细胞催化 CA 合成体系的组建

工程菌株 BL-sodAprm 于 LB 平板划线并置 于37 ℃过夜培养。随后挑取单菌落接种于3 mL LB 培养基中(含 50 mg/L 硫酸卡那霉素),于 37 ℃、220 r/min 过夜培养。以 1%的接种量接 种至含有 100 mL LB 培养基(含 50 mg/L 硫酸卡 那霉素)的锥形瓶中于 37 ℃、220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub>=0.6; 随后加入 0.1 mmol/L IPTG, 并于 24 ℃、220 r/min 条件下继续培养 18 h。培养结 束后于4℃、4000 r/min 离心 20 min 收集菌体。 然后,分别称取湿重为 0.04、0.07、0.1、0.2 g 的菌体并用 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.4)缓 冲液进行重悬而制得用于 CA 合成的全细胞催 化体系。随后分别向反应体系中加入 5 mmol/L 3-HA 后于 30 ℃、220 r/min 条件下孵育 4 h。 然后于4℃、13 000 r/min 的条件下离心 10 min 收集上清液。将上清液稀释于甲醇溶液中后经 离心和 0.22 μm 滤膜过滤后进行 CA 测定。随之 将上述优化后的催化条件用于 CA 合成最佳催 化时间的评估。基于上述全细胞催化体系的最 佳反应参数,进一步尝试 CA 的大体积合成实 验:反应体系为10 mL。

#### 1.3.5 CA 检测方法

本研究将分别采用光谱吸收和 HPLC 进行 CA 的定量。在 CA 合成体系的构建和高通量筛 选过程中,针对高样本量的 CA 测定与分析, 直接采用 SpectraMax 190 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司)进行。对于扩大体积的 CA 体外酶学合成和全细胞催化合成反应,采用 HPLC 法进行 CA 的定量分析。液相分析 (E2695, Waters 公司)采用安捷伦 ZORBAX SB C18 液相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 µm)。流动 相 A 相为超纯水(0.1%三氟乙酸), B 相为乙腈; 液相流速为1 mL/min, 柱温为25 ℃, 检测波 长 450 nm。化合物分析的 HPLC 梯度洗脱程序 如下: 0.0-0.1 min B 相为 10%, 0.1-7.0 min B 相从 10%线性增加至 40%, 7.0-12.0 min B 相从 40%线性增加至70%,12.0-15.0 min B相从70% 线性增加至 100%, 15.0-20.0 min B 相稳定在 100%, 20.0-23.0 min B 相从 100%线性递减至 10%, 并于 10%比例下维持 5 min。

#### 1.3.6 数据统计分析

在本研究中,实验数据均采集自 3 个生物 样本量的平均值。数据的误差线(error bar)代表 所采集数据的标准差(standard deviation, SD)。 实验数据均利用 GraphPad 6.0 进行分析。

## 2 结果与分析

#### 2.1 CA光谱学特性分析

为实现对 CA 合成参数的快速表征和测定, 一种高通量的 CA 检测方法是必要的。CA 是一 种含 N-杂环的吩恶嗪酮类化合物且在 450 nm 具有特定的光吸收谱<sup>[1,28]</sup>。据此,首先对 CA 的 光谱吸收值进行了测定。通过对 CA 的吸光谱 进行全波长(340–700 nm)扫描,进一步证明 CA 仅于 450 nm 处有单一的光吸收谱(图 2A)。在此 基础上构建了不同 CA 浓度和光吸收值之间的 线性关系图(图 2B)。数据的采集为后期 CA 的 大通量表征提供了研究基础。



图 2 CA 的吸光谱(A)和吸光值-浓度曲线(B)测定 Figure 2 Determination of CA absorbance spectra (A) and absorption-concentration curve (B).

2.2 不同来源 SOD 酶的纯化和活性表征

锰超氧化物歧化酶(Mn<sup>2+</sup> SOD)是一类典型 的超氧自由基(O2<sup>--</sup>)消除酶系<sup>[25-26]</sup>。依据 CA 合 成机制的前期研究结果,选定了来源于酿酒酵 母(GenBank 登录号: NP 011872)、大肠杆菌 (GenBank 登录号: ACT43484)和 P. megaterium HBM (GenBank 登录号: ADE71525)来源的 Mn<sup>2+</sup>依赖型 SOD 酶系。通过质粒构建、蛋白表 达与纯化和 SDS-PAGE 分析后发现(图 3A), 异 源过表达与纯化获得蛋白 SodAsce、SodAEco 和 SodAprm 的 SDS-PAGE 分析结果与数据库中注 释的相应 SOD 酶系的大小一致(均约为 25 kDa), 表明实现了对不同来源 SOD 酶系的可溶性表 达和纯化。随后,对纯化获得的蛋白 SodAsce、 SodA<sub>Eco</sub>和 SodA<sub>Prm</sub>进行了 CA 的催化合成研究 以评估其活性。通过对酶催化产物 CA 的定量 分析,发现 SodA<sub>Prm</sub>具有更好的 CA 合成能力, 产量为(5.0±0.1) mg/L。基于此, SodA<sub>Prm</sub>将用于 进一步的 CA 生物合成研究。



#### 图 3 不同 SOD 酶的 SDS-PAGE 图谱(A)及催化 活性评价(B)

Figure 3 Profiles of SDS-PAGE (A) and evaluation of catalytic activity (B) of different SOD enzymes.

#### 2.3 体外酶学催化 CA 合成

以上述筛选到的 SodAprm 为基础,本研究首 先测试了不同缓冲液对 SodApm 催化能力的影响。 共测试了包括 0.1 mol/L CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa (pH 4.4) 0.1 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.4) 0.1 mol/L HEPES (pH 7.4), 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.4)和 0.1 mol/L Glycine-NaOH (pH 10.0)在 内的 5 种酶学反应缓冲液。通过对催化产物 CA 的光吸收值测定后发现(图 4A),在 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.4)条件下, SodAprm 可以高效地 合成(14.4±1.7) mg/L 的 CA。此后,进一步通过金 属离子依赖性测定后发现(图 4B),相较于初始条 件下的 CA 合成水平, Zn<sup>2+</sup>对 SodA<sub>Pm</sub> 酶催化 CA 合成的能力具有一定的抑制作用, CA 产量仅为 (2.0±0.3) mg/L, 而 Cu<sup>2+</sup>的使用则可极大地促进 SodA<sub>Prm</sub> 酶催化合成 CA 的能力,此时 CA 产量 可达(40.0±2.0) mg/L。以此为基础,本研究进一 步评估了金属离子组合对 SodAprm 催化性能的 影响。如图 4C 所示, SodA<sub>Prm</sub>在 Cu<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>组合 的应用下可进一步将 CA 的合成水平提高到 (54.2±2.1) mg/L。另外发现不同起始浓度的 3-HA同样影响着 SodApm 酶对 CA 的合成能力。 如图 4D 和 4E 所示, 在 5 mmol/L 3-HA 的情况



**图 4** CA 体外酶学催化体系的构建和应用 A:缓冲液的优化; B、C:金属离子的测试; D、E:初始 3-HA 使用浓度的优化; F:初始 SodA<sub>Pm</sub>使用量的优化; G:大体系 CA 合成。

Figure 4 Construction and application of *in vitro* CA enzymatic catalytic system. A: Optimization of the reaction buffers; B, C: Testing of metal ions; D, E: Optimization of initial added concentration of 3-HA; F: Optimization of initial doses of SodA<sub>Prm</sub>; G: Large-scale biosynthesis of CA.

下,SodA<sub>Prm</sub>可将CA的合成水平进一步提高到 (116.7±7.1)mg/L,相较于1mmol/L3-HA的反 应条件提高了2.2倍;但是,3-HA浓度的进一 步提高未能促进CA的更高效合成。最后,还 发现酶SodA<sub>Prm</sub>的初始使用量同样影响着CA 的合成效率。如图4F所示,当将SodA<sub>Prm</sub>的使 用量提高到3 µmol/L时,CA的积累水平可以 达到(176.6±14.3)mg/L;然而,酶使用量的进一 步提升同样未能更有效地促进CA的合成。最后, 基于上述优化后的CA合成参数,进一步尝试了 1mL反应体系下的CA体外酶学合成反应。如图 4G所示,在大体积体外酶学反应条件下最终实 现了高达(125.2±2.8)mg/L的CA合成。

#### 2.4 全细胞催化 CA 合成

在体外合成 CA 研究的基础上,本研究进一步构筑了基于大肠杆菌的 CA 全细胞催化合成体

系 BL-sodA<sub>Prm</sub>和 BL-Con。首先,在 0.1 g 细胞湿 重条件下进行了全细胞催化体系的可用性测试。 如图 5A 所示, 通过对构筑的 CA 全细胞催化系统 BL-sodApm 和 BL-Con 进行 CA 合成测试, 证实工 程菌株 BL-sodApm 可以用于 CA 的合成。在此基 础上,首先测试了催化剂 BL-sodApm 使用量对 CA 合成的影响。结果如图 5B 所示,当细胞使用量为 0.07 g (湿重)时可以实现对 CA 的最高效合成,其 产量最高可达 312.3 mg/L。如表 3 所示,该产量 为目前报道的生物法合成 CA 的最高水平。在此 基础上,通过测试反应时间,发现 BL-sodA<sub>Pm</sub>催 化CA合成的最佳反应时间为4h(图5C)。基于上 述实验数据,进一步构建了大体积的 CA 合成系 统。如图 5D 所示,当将 CA 的合成体系由 1 mL 直接一步扩大到 10 mL 之后,最终于 4 h 内实现 了(168.8±13.3) mg/L 的 CA 合成。



**图 5** CA 全细胞催化合成体系的构建与应用 A: CA 全细胞催化合成体系的测试; B: 催化剂使用 量对 CA 合成的影响; C: CA 合成的时间曲线; D: CA 大体系合成。

Figure 5 Construction and application of the whole cell catalytic system for CA synthesis. A: Testing of whole cell catalytic system for CA synthesis; B: The effects of catalyst dose on CA synthesis; C: Time course of CA synthesis; D: Large-scale biosynthesis of CA.

Table 5 Biosynthetic levels of CA							
Enzyme types	CA synthetic strategies	Titer	References				
Horseradish peroxidase	In vitro crude HRP catalyzed 3-HA to CA	1.2 mg/L	[19]				
-	Light irradiation of the cultured P. Cinnabarinus	20.0 mg/g DCW	[20]				
Laccase	Continuous cultivation of P. cinnabarinus for 7 days	21.0 mg/L	[28]				
Spore coat protein CotA	System metabolic engineering of the <i>P. chlororaphis</i> GP72 and optimization of CA biosynthetic conditions	136.2 mg/L	[12]				
Superoxide dismutase	Whole cell biotransformation of 3-HA to CA by thymocytes	9.0 mg/L	[9]				
Superoxide dismutase	Whole cell biotransformation of 3-HA to CA by BL-sodA <sub>Prm</sub>	312.3 mg/L	This study				

#### 表 3 CA 生物合成水平

Table 3 Biosynthetic levels of CA

DCW: Dry cell weight.

## 3 讨论与结论

CA 是一种功能多元化且应用广泛的天然 含氮吩恶嗪酮类化合物<sup>[1-3]</sup>。结构的特殊性造就 了 CA 独特的光谱吸收特性<sup>[28]</sup>(图 2A)。在自然 界中, CA 主要通过缩合 2 分子犬尿氨酸途径中 间代谢物 3-HA 进行合成<sup>[17]</sup>。研究证实,漆酶、 过氧化氢酶和超氧化物歧化酶等酶系均可催化 3-HA 合成 CA<sup>[16-19]</sup>。此外,来源于抗菌链球菌 (*Streptomyces antibioticus*)的多铜氧化酶和枯草 芽孢杆菌 168 的孢子外壳蛋白 CotA 同样具有吩 恶嗪酮合酶功能<sup>[12,29]</sup>。然而,尽管有许多 CA 合 成酶系,但目前 CA 高效生物合成系统的开发依 然主要集中于对天然 CA 积累生物体发酵条件的 优化或非天然工程菌的再构筑<sup>[3,12,20-21]</sup>。如 Yue 等<sup>[12]</sup>借助模块化代谢工程策略在 *P. chlororaphis* GP72 内首次实现了 CA 的从头合成。然而,极低的 CA 得率却极大地限制了将其应用于大规模的 CA 合成研究<sup>[12,20-21]</sup>。因此,开发高效 CA 合成系统是必要的。

生物合成尤其是全细胞催化已发展成为一种新型的化合物生产技术<sup>[30]</sup>。本研究提出了一 套基于体外酶学催化和全细胞催化 CA 合成的技 术方案。首先,针对限制 CA 合成过程中存在的 关键限制因素——超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>--</sup>)的积累<sup>[23-24]</sup>, 通过对来源于真核生物和原核生物中 Mn<sup>2+</sup>依赖 型 SOD 酶系的分析、筛选和表征后获得了一个 可高效消除 O<sub>2</sub><sup>--</sup>的超氧化物歧化酶 SodA<sub>Pm</sub>,并通 过催化条件的优化实现了高达(176.6±14.3) mg/L

的 CA 合成。然而,与既往研究指出仅 Mn<sup>2+</sup>可 提升 Mn<sup>2+</sup>依赖 SOD 酶系的催化能力相比<sup>[26,31]</sup>, 本研究发现 Cu<sup>2+</sup>离子的加入同样可极大地提升 Mn<sup>2+</sup>依赖 SOD 酶系的催化能力(图 4B), 且提升 能力更明显。推测该现象可能是由于以下原因: (1) SodApm 酶在过表达和纯化过程中酶活性位 点的 Mn<sup>2+</sup>离子饱和度不足; (2) 体外酶催化过 程中酶对金属离子亲和力的专一性不强[32-33]。 如 Ose 等<sup>[34]</sup>和 Yamakura 等<sup>[35]</sup>研究表明原核和 真核生物来源的 SOD 酶具有宽泛的金属离子 亲和性。与之相同的是, Yue 等<sup>[12]</sup>利用甘油合 成CA的研究工作同样表明Cu<sup>2+</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的补充 可有效促进 CA 的合成。随后,本研究在体外 酶催化 CA 合成的基础上进一步实现了基于全 细胞催化 CA 合成的设想。然而,如图 5 所示, 在利用全细胞催化 CA 合成的研究过程中,产 物 CA 的合成效率开始时随着细胞使用量的增 加而增加,之后随着细胞使用量的增加而急速 降低。推测催化剂的高剂量投入所造成反应体 系的溶氧不足是限制 CA 合成的关键因素<sup>[18]</sup>。

总之,本研究构建了一套生物法 CA 高效合成方案。首先,通过对不同来源 SOD 酶系的筛选和催化条件的优化实现了高达(176.6±14.3) mg/L的 CA 合成。此后,基于 SodA<sub>Prm</sub>构筑了一种用于 CA 合成的全细胞催化体系 BL-sodA<sub>Prm</sub> 催化条件的优化最大实现了 312.3 mg/L 的 CA 合成;并在此基础上利用大尺度反应体系证实了该系统在 CA 生物合成中的应用潜力。然而,如何实现更高效的 CA 合成效率仍是需要进一步解决的核心问题之一。本研究不仅拓展了 CA 的生物法合成策略,而且为其他吩恶嗪酮类衍生物如寻霉素(questiomycin)、ommatin D 和 actinocin 等的高效生物法合成奠定了坚实的研究基础<sup>[12,22]</sup>。

#### 作者贡献声明

胡娟:实验操作、数据分析、初稿写作; 张东洋:实验操作、文献调研与收集;石柳柳、 赵小英:实验指导、稿件润色修改;李心利: 实验方案设计、监督指导、稿件润色修改。

#### 作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告 工作的已知经济利益或个人关系。

#### REFERENCES

- GÖÇENOĞLU SARIKAYA A, PAZARLIOGLU N. Cinnabarinic acid: enhanced production from *Pycnoporus cinnabarinus*, characterization, structural and functional propserties[J]. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 2014, 2(42): 281-290.
- [2] GÖÇENOĞLU SARIKAYA A, OSMAN B, KARA A, PAZARLIOGLU N, BEIRLI N. Adsorption of cinnabarinic acid from culture fluid with magnetic microbeads[J]. Biomedical Chromatography, 2016, 30(2): 88-96.
- [3] GAWEL K. A review on the role and function of cinnabarinic acid, a "forgotten" metabolite of the kynurenine pathway[J]. Cells, 2024, 13(5): 453
- [4] FAZIO F, LIONETTO L, MOLINARO G, BERTRAND HO, ACHER F, NGOMBA RT, NOTARTOMASO S, CURINI M, ROSATI O, SCARSELLI P, Di MARCO R, BATTAGLIA G, BRUNO V, SIMMACO M, PIN JP, NICOLETTI F, GOUDET C. Cinnabarinic acid, an endogenous metabolite of the kynurenine pathway, activates type 4 metabotropic glutamate receptors[J]. Molecular Pharmacology, 2012, 81(5): 643-656.
- [5] JOSHI AD, CARTER DE, HARPER TA Jr, ELFERINK CJ. Aryl hydrocarbon receptor-dependent stanniocalcin 2 induction by cinnabarinic acid provides cytoprotection against endoplasmic reticulum and oxidative stress[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2015, 353(1): 201-212.
- [6] PASCERI R, SIEGEL D, ROSS D, MOODY CJ. Aminophenoxazinones as inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Synthesis of exfoliazone and chandrananimycin A[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 56(8): 3310-3317.
- [7] FAZIO F, ZAPPULLA C, NOTARTOMASO S, BUSCETI C, BESSEDE A, SCARSELLI P, VACCA C, GARGARO M, VOLPI C, ALLEGRUCCI M, LIONETTO L, SIMMACO M, BELLADONNA ML, NICOLETTI F, FALLARINO F. Cinnabarinic acid, an endogenous agonist of type-4 metabotropic glutamate receptor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice[J]. Neuropharmacology, 2014, 81: 237-243.

- [8] PATIL NY, RUS I, DOWNING E, MANDALA A, FRIEDMAN JE, JOSHI AD. Cinnabarinic acid provides hepatoprotection against nonalcoholic fatty liver disease[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2022, 383(1): 32-43.
- [9] HIRAMATSU R, HARA T, AKIMOTO H, TAKIKAWA O, KAWABE T, ISOBE KI, NAGASE F. Cinnabarinic acid generated from 3-hydroxyanthranilic acid strongly induces apoptosis in thymocytes through the generation of reactive oxygen species and the induction of caspase[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2008, 103(1): 42-53.
- [10] LOWE MM, MOLD JE, KANWAR B, HUANG Y, LOUIE A, POLLASTRI MP, WANG CH, PATEL G, FRANKS DG, SCHLEZINGER J, SHERR DH, SILVERSTONE AE, HAHN ME, McCUNE JM. Identification of cinnabarinic acid as a novel endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that drives IL-22 production[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e87877.
- [11] NOTARTOMASO S, BOCCELLA S, ANTENUCCI N, RICCIARDI F, FAZIO F, LIBERATORE F, SCARSELLI P, SCIOLI M, MASCIO G, BRUNO V, BATTAGLIA G, NICOLETTI F, MAIONE S, LUONGO L. Analgesic activity of cinnabarinic acid in models of inflammatory and neuropathic pain[J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2022, 15: 892870.
- [12] YUE SJ, SONG C, LI S, HUANG P, GUO SQ, HU HB, WANG W, ZHANG XH. Synthesis of cinnabarinic acid by metabolically engineered *Pseudomonas chlororaphis* GP72[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(11): 3072-3083.
- [13] IIZUKA H, OBATA K, YAJIMA T, ICHIBA H, FUKUSHIMA T. Development of a fluorimetric detection method for cinnabarinic acid using *ortho*-tolyl hydrazine as the derivatization reagent[J]. Biomedical Chromatography, 2010, 24(3): 231-234.
- [14] KAKOTI M, DULLAH S, HAZARIKA DJ, BAROOAH M, BORO RC. Cinnabarinic acid from *Trametes coccinea* fruiting bodies exhibits antibacterial activity through inhibiting the biofilm formation[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(3): 173.
- [15] OGAWA H, NAGAMURA Y, ISHIGURO I. Cinnabarinic acid formation in Malpighian tubules of the silkworm, *Bombyx mori*. Participation of catalase in cinnabarinic acid formation in the presence of manganese ion[J]. Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie, 1983, 364(8): 1059-1066.
- [16] HAHN V. Potential of the enzyme laccase for the synthesis and derivatization of antimicrobial compounds[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2023, 39(4): 107.

- [17] ISHII T, IWAHASHI H, SUGATA R, KIDO R, FRIDOVICH I. Superoxide dismutases enhance the rate of autoxidation of 3-hydroxyanthranilic acid[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1990, 276(1): 248-250.
- [18] IWAHASHI H, ISHII T, SUGATA R, KIDO R. Superoxide dismutase enhances the formation of hydroxyl radicals in the reaction of 3-hydroxyanthranilic acid with molecular oxygen[J]. Biochemical Journal, 1988, 251(3): 893-899.
- [19] CHRISTEN S, SOUTHWELL-KEELY PT, STOCKER R. Oxidation of 3-hydroxyanthranilic acid to the phenoxazinone cinnabarinic acid by peroxyl radicals and by compound I of peroxidases or catalase[J]. Biochemistry, 1992, 31(34): 8090-8097.
- [20] SCHINAGL CW, SIEWERT B, HAMMERLE F, SPES G, PEINTNER U, SCHLIERENZAUER M, VRABL P. Growth, morphology, and formation of cinnabarin in *Pycnoporus cinnabarinus* in relation to different irradiation spectra[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2023, 22(12): 2861-2875.
- [21] MENG D, SHAO X, LUO SP, TIAN QP, LIAO XR. Pigment production by a newly isolated strain *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7 in solid-state fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1015913.
- [22] SHARMA K, GHIFFARY MR, LEE G, KIM HU. Efficient production of an antitumor precursor actinocin and other medicinal molecules from kynurenine pathway in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2024, 81: 144-156.
- [23] 张旭,张蕾,许鹏琳,李天然,晁瑞青,韩正好. 锰超氧化物歧化酶的催化原理与酶活性调节机制[J]. 生物化学与生物物理进展,2024,51(1):20-32.
  ZHANG X, ZHANG L, XU PL, LI TR, CHAO RQ, HAN ZH. The catalytic mechanism and activity modulation of manganese superoxide dismutase[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2024, 51(1): 20-32 (in Chinese).
- [24] MANTHEY MK, PYNE SG, TRUSCOTT RJW. Mechanism of reaction of 3-hydroxyanthranilic acid with molecular oxygen[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1990, 1034(2): 207-212.
- [25] LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. The oxidation of 3-hydroxyanthranilic acid by Cu, Zn superoxide dismutase: mechanism and possible consequences[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 388(2): 281-284.
- [26] SHENG YW, BUTLER GRALLA E, SCHUMACHER M, CASCIO D, CABELLI DE, VALENTINE JS. Six-coordinate manganese(3+) in catalysis by yeast manganese superoxide dismutase[J]. Proceedings of

the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(36): 14314-14319.

- [27] ROYCHOUDHURY A, BASU S, SENGUPTA DN. Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors[J]. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2009, 46(5): 395-400.
- [28] EGGERT C, TEMP U, DEAN JFD, ERIKSSON KE L. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid[J]. FEBS Letters, 1995, 376(3): 202-206.
- [29] Le ROES-HILL M, GOODWIN C, BURTON S. Phenoxazinone synthase: what's in a name?[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(4): 248-258.
- [30] de CARVALHO CCCR. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(1): 75-83.
- [31] RAO PV, VAIDYANAHAN CS. Enzymic conversion of 3-hydroxyanthranilic acid into cinnabarinic acid.

Partial purification and properties of rat-liver cinnabarinate synthase[J]. Biochemical Journal, 1966, 99(2): 317-322.

- [32] OSE DE, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. reversible removal of manganese and its substitution by cobalt, nickel or zinc[J]. Journal of Biological Chemistry, 1976, 251(4): 1217-1218.
- [33] MILLER AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 8(2): 162-168.
- [34] OSE DE, FRIDOVICH I. Manganese-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*: reversible resolution and metal replacements[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1979, 194(2): 360-364.
- [35] YAMAKURA F, KOBAYASHI K, FURUKAWA S, SUZUKI Y. In vitro preparation of iron-substituted human manganese superoxide dismutase: possible toxic properties for mitochondria[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2007, 43(3): 423-430.