

重组枯草芽胞杆菌不对称还原产 *d*-伪麻黄碱

彭艳红^{1,2}, 张梁^{1,2}, 丁重阳^{1,2}, 王正祥^{1,2}, 石贵阳^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 生物资源与生物能源研究中心, 无锡 214122

摘要: 为了实现羰基还原酶基因 *mldh* 在枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 中的表达并通过细胞内的葡萄糖脱氢酶完成辅酶的再生, 以枯草芽胞杆菌 *rpsD* 基因的启动子 *PrpsD* 和终止子 *TrpsD* 为表达元件, 将羰基还原酶基因 *mldh* 连接至构建好的质粒(pHY300plk-*PrpsD*-*TrpsD*)上, 得到质粒 pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD*; 进一步将重组质粒转化入 *B. subtilis* Wb600 中获得重组菌 *B. subtilis* Wb600 (pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD*); 对此重组菌进行全细胞生物转化反应实验发现, 在葡萄糖存在的情况下, 其可转化底物 1-苯基-2-甲氨基丙酮 (简称 MAK) 生成 *d*-伪麻黄碱, 产量最高达 97.5 mg/L, 底物摩尔转化率为 24.1%。研究结果为利用重组 *B. subtilis* 生物转化生产 *d*-伪麻黄碱进行了有益探索。

关键词: 枯草芽胞杆菌, 羰基还原酶, 全细胞生物转化, *d*-伪麻黄碱

Asymmetric biosynthesis of *d*-pseudoephedrine by recombinant *Bacillus subtilis*

Yanhong Peng^{1,2}, Liang Zhang^{1,2}, Zhongyang Ding^{1,2}, Zhengxiang Wang^{1,2}, and Guiyang Shi^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 Center for Bioresource & Bioenergy, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In order to successfully express the carbonyl reductase gene *mldh* in *Bacillus subtilis* and complete coenzyme regeneration by *B. subtilis* glucose dehydrogenase, the promoter *PrpsD* and the terminator *TrpsD* from *B. subtilis rpsD* gene were used as the expression cassette to be a recombinant plasmid pHY300plk-*PrpsD*-*TrpsD*. After that, the carbonyl reductase gene *mldh* was inserted into the previous plasmid and a plasmid pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD* was achieved, followed by transformed into *B. subtilis* Wb600 to obtain a recombinant *B. subtilis* Wb600 (pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD*). Subsequently, the results for whole-cell biotransformation from recombinant *B. subtilis* showed that it could be used to catalyze MAK (1-phenyl-1-keto-2-methylaminopropane) to *d*-pseudoephedrine in the presence of glucose. The yield of *d*-pseudoephedrine could be up to 97.5 mg/L and the conversion rate of MAK was 24.1%. This study indicates the possibility of biotransformation production of *d*-pseudoephedrine from recombinant *B. subtilis*.

Received: October 8, 2010; **Accepted:** January 25, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30770054), Innovative Research Team of Jiangsu Province, 2008.

Corresponding author: Guiyang Shi. Tel: +86-510-85918229; E-mail: biomass_jnu@126.com

国家自然科学基金 (No. 30770054), 2008 年度江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队资助。

Keywords: *Bacillus subtilis*, carbonyl reductase, whole-cell biotransformation, *d*-pseudoephedrine

麻黄碱 (Ephedrine), 化学名为 1-苯基-2-甲氨基丙醇, 是一种从天然植物麻黄草中分离而得到的芳香族氨基醇衍生物, 其立体异构体 *l*-麻黄碱和 *d*-伪麻黄碱, 分别主要用作支气管扩张剂和解充血剂, 具有较强的药理作用, 广泛应用于临床医疗中^[1-3]。工业生产中, 麻黄碱主要来源于麻黄植物直接提取和化学合成, 但这两种方法分别由于存在原料来源有限、生产成本低和异构体分离困难、环境污染等问题而限制了其发展^[4]。利用生物转化法制备光学纯的手性化合物具有反应条件温和, 产物单一, 立体选择性、区域选择性和化学选择性较高, 并能完成一些化学合成难以进行的反应等优点, 是大规模生产手性化合物的理想途径之一, 具有巨大发展潜力^[5]。

本研究室前期成功筛选得到一株能够利用 1-苯基-2-甲氨基丙酮 (1-phenyl-2-methylamino-propanone, 简称 MAK) 为底物专一性转化生成 *d*-伪麻黄碱的菌株摩氏摩根菌 *Morganella morganii* CMCC(B)49208^[1], 从中分离纯化出调控此生物转化过程的羰基还原酶 (MLDH), 并利用基因工程手段使其在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中进行了高效的表达。但是由于羰基还原酶在催化生物转化反应时需要一定量的辅酶作为电子传递体, 该酶在转化 MAK 为 *d*-伪麻黄碱的过程中需要辅酶 NADH 来提供还原力^[6-7], 如若通过外加辅酶提供则成本会大大增加, 这极大地制约了其在工业上的应用。而通过大肠杆菌在同一质粒上共表达羰基还原酶基因 *mldh* 和葡萄糖脱氢酶基因 *gdh*, 由于本身 MLDH 酶活力不高且再生的辅酶不足等原因, 导致最终产物产量并不高^[8]。

枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 是目前研究较为详尽的外源基因表达宿主, 其葡萄糖脱氢酶 (Glucose dehydrogenase, GDH) 可以氧化葡萄糖生成葡萄糖酸同时生成还原型的辅酶 NADH (NADPH)^[9-10]。利

用酶耦联法可以解决生物转化制备麻黄碱的过程中辅酶的再生问题。目前, 国内外对利用 *B. subtilis* 生物转化生产 *d*-伪麻黄碱的研究很少, 未见相关报道。本研究通过构建枯草芽胞杆菌游离表达质粒 pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD* 转化入 *B. subtilis* Wb600 (蛋白酶缺陷型菌株) 中使得羰基还原酶能够在枯草芽胞杆菌中表达并通过细胞内的 GDH 完成辅酶的再生, 而避免外源性的加入, 同时对重组菌专一性转化产 *d*-伪麻黄碱进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* JM109、*B. subtilis* Wb600、大肠-枯草杆菌穿梭载体 pHY300plk 由江南大学工业微生物资源和信息中心 (CICIM-CU) 提供; pET28a-*mldh* 由本研究室构建并保存; 质粒 pHY300plk-*PrpsD*-*TrpsD*、pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD* 及菌株 *B. subtilis* Wb600 (pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD*) 为本研究中构建。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7.0~7.2; 制备固体培养基时另加入 1.5% 琼脂粉; 121 °C 灭菌 20 min。用于大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的培养, 必要时, 使用前加入氨苄青霉素 (Amp) 至终浓度 100 mg/L 用于重组大肠杆菌的筛选, 加入四环素 (Tet) 至终浓度 15 mg/L 用于重组枯草芽胞杆菌的筛选。

1.1.3 工具酶和试剂

溶菌酶、核糖核酸酶、蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶、*pfu* DNA 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、NADH、限制性内切酶 (*Xba* I、*Kpn* I、*Bam*H I 等)、碱性磷酸酶 (CIAP) 均购于上海生工生物工程技术服务有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、质粒 DNA

小量制备试剂盒、DNA Marker λ *Pst* I 购于博大泰克；胶回收试剂盒购于碧云天生物公司；四环素盐酸盐 (Tetracycline HCl) 购于北京拜尔迪生物技术有限公司；*l*-麻黄碱 (E) 和 *d*-伪麻黄碱 (PE) 化学对照品购于中国药品生物制品鉴定所；1-苯基-2-甲氨基丙酮 (MAK) 为本研究室合成；其他试剂药品皆为国产或进口的分析纯和生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 *B. subtilis* Wb600 染色体 DNA 的提取

提取方法见文献[11-12]，略有修改。

1.2.2 常规分子生物学基因操作

DNA 片段胶回收、PCR 产物纯化用相应的试剂盒进行。质粒 DNA 提取、DNA 的酶切、连接、大肠杆菌感受态细胞的制备和转化等常规分子操作参见文献[11-12]。

1.2.3 基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 上的枯草芽胞杆菌 168 菌株 (登录号: NC_000964.3) *rpsD* 基因的启动子和终止子的基因序列, 设计引物 PrpsD_F 和 PrpsD_R, TrpsD_F 和 TrpsD_R, 引物序列见表 1, 由上海生物工程技术有限公司合成。

表 1 文中所用引物及其序列

Table 1 Primers and oligonucleotides used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')*	Restriction site
PrpsD_F	<u>GCGTCGAC</u> CGGCGGATAATTG ATCTTTA	<i>Sal</i> I
PrpsD_R	GCGGAT <u>CCG</u> CCTTATGACTCCT CCTTTGG	<i>Bam</i> H I
TrpsD_F	GCGGAT <u>CCT</u> AAAAACCCCTGC CGCTATG	<i>Bam</i> H I
TrpsD_R	GAAGAT <u>CTC</u> TGGAAGTTGAC AGCACCCAA	<i>Bgl</i> II

*The restriction site (underlined) are indicated.

PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 冷却至 4 °C, 结束反应。PCR 产物经纯化后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 载体 pHY300plk-PrpsD-TrpsD 的构建

Bam H I 酶切质粒 pHY300plk, 纯化后在 *pfu*

DNA 聚合酶作用下 72 °C 延伸 10 min, 补平其上的 *Bam* H I 位点, 得到载体 pHY300plk-*Bam* H I (-)。 *Sal* I、*Bam* H I 酶切 *PrpsD* 片段, *Bam* H I、*Bgl* II 酶切 *TrpsD* 片段后与经 *Sal* I、*Bgl* II 酶切的 pHY300plk-*Bam* H I (-) 质粒连接转化感受态细胞 *E. coli* JM109, 利用氨苄青霉素抗性筛选出重组子酶切验证。

1.2.5 游离表达载体 pHY300plk-PrpsD-mldh-TrpsD 的构建

Bam H I 酶切质粒 pET28a-*mldh* 后回收 *mldh* 片段, 与经 *Bam* H I 酶切的 pHY300plk-*PrpsD*-*TrpsD* 连接转化 *E. coli* JM109, 利用 Amp 抗性筛选出重组子酶切验证。同时, 以阳性质粒为模板 PCR 扩增后检测。另测定 *PrpsD-mldh-TrpsD* 基因序列, 以确保 PCR 扩增序列的准确性, 序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.2.6 重组菌 *B. subtilis* Wb600(pHY300plk-PrpsD-mldh-TrpsD) 的构建

提取质粒 pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*, 参考文献[13]所述方法制备枯草杆菌化学感受态并转化 *B. subtilis* Wb600, 利用 Tet (15 mg/L) 抗性筛选重组子, 提取阳性转化子质粒, 以之前构建好的质粒 pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD* 为对照, 分别酶切后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 细胞裂解液的制备

挑取阳性重组枯草芽胞杆菌转化子单菌落, 接入含有 Tet (15 mg/L) 的 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养 12 h。次日, 按接入培养基体积 3% 的接种量转接至含有 Tet (15 mg/L) 的 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养 12 h。离心收集菌体, 用磷酸缓冲液 (0.2 mol/L KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液 (pH 7.5), 以下出现磷酸缓冲液如未加说明均指该磷酸钠钾缓冲液) 洗涤 1~2 次, 离心后再用适量的预冷的磷酸缓冲液重悬菌体。超声波破碎 10 min (工作 1 s 停 4 s), 保持菌液始终处于低温 (0 °C~4 °C)。破壁后高速离心, 上清液即为细胞裂解物, 用于

SDS-PAGE 和生物转化反应检测。

1.2.8 重组菌 *B. subtilis* Wb600(pHY300plk-PrpsD-*mldh*-TrpsD) 的鉴定

挑取经 1.2.6 所示方法酶切验证的阳性重组枯草芽胞杆菌转化子接种于 LB 液体培养基, 按 1.2.7 的方法制备细胞裂解液, SDS-PAGE 检测, 电泳的方法和操作见文献[14]。同时, 取重组菌菌体破碎液进行生物转化反应。反应体系为: 50 μ g MAK, 50 μ mol 葡萄糖, 1 μ mol NADH 和适量酶液共 1 mL, 30 $^{\circ}$ C 转化 24 h。10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液用于高效液相色谱法 (HPLC) 和超高效液相色谱-质谱联用法 (UPLC-MS) 检测。

高效液相色谱法 (HPLC)^[6]检测条件: Hanbon Lichrospher C18 柱; 检测波长 210 nm; 流速 1 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C。流动相为: 甲醇: 0.02 mol/L KH₂PO₄: 乙酸: 三乙胺=4: 96: 0.2: 0.13 (V:V:V:V)。超高效液相色谱-质谱联用法 (UPLC-MS) 检测条件: (A) 色谱条件 色谱仪: Waters ACQUITY UPLC; 检测器: Waters ACQUITY PDA; 分析柱: ACQUITY UPLC BEH HILIC (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m); 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 20 mmol/L 醋酸铵水溶液; 检测波长: 200~600 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流速: 0.30 mL/min; 总分析时间: 15 min; 进样体积: 1.0 μ L。(B) 质谱条件 质谱系统: Waters SYNAPT MS 检测仪; 软件: Waters Masslynx V4.1 质谱工作站; 离子源: ESI 电离源; 电离模式: ESI+; 毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 20 V; 离子源温度: 100 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度: 250 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气流量: 500 L/h; 锥孔气流量: 50 L/h; 碰撞能量: 6 eV; 探测器电压: 1 600 V; 扫描 *m/z* 范围: 50~500 Da; 选择离子: *m/z* 164、*m/z* 166。

1.2.9 重组菌 *B. subtilis* Wb600 (pHY300plk-PrpsD-*mldh*-TrpsD) 全细胞不对称还原反应

取适量培养一定时间的重组菌湿菌体加入适量 MAK 及葡萄糖, 用 pH 7.5 的磷酸缓冲液补足至 1 mL, 30 $^{\circ}$ C 转化 24 h。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清用于 HPLC 检测。HPLC 检测条件同 1.2.8。

表 2 液相色谱流动相梯度洗脱表

Table 2 UPLC gradient table

Time (min)	Flow (mL/min)	Rate A%	Rate B%	Curve
0.0	0.3	95.0	5.0	-
0.1	0.3	95.0	5.0	7
10.0	0.3	70.0	30.0	7
12.0	0.3	70.0	30.0	6
12.1	0.3	95.0	5.0	6

2 结果与分析

2.1 载体 pHY300plk-PrpsD-TrpsD 的构建

提取阳性菌落的质粒 DNA, 进行 *Sal* I、*Bgl* II 双酶切, 电泳检测结果显示, 酶切后出现 4.9 kb、820 bp 两条带, 4.9 kb 正是载体 (pHY300plk) 的大小, 而 820 bp 为目的连接片段 (*PrpsD*-*TrpsD*) 的大小, 说明该质粒已同时插入 *PrpsD* 和 *TrpsD* 片段, 为重组质粒 pHY300plk-*PrpsD*-*TrpsD*。

2.2 游离表达载体 pHY300plk-PrpsD-*mldh*-TrpsD 的构建

提取阳性菌落的质粒 DNA 进行酶切, 电泳结果如图 1A 所示, *Bam*H I 酶切后出现两条带, 分别为 5.7 kb 和 1.1 kb, 5.7 kb 是载体 pHY300plk-*PrpsD*-*TrpsD* 的大小, 而 1.1 kb 为目的片段 (*mldh*) 的大小, 说明片段 *mldh* 已插入质粒中; *Sal* I、*Bgl* II 双酶切后出现两条带, 分别为 4.9 kb 和 1.9 kb, 4.9 kb 为载体 pHY300plk 的大小, 1.9 kb 为片段 *PrpsD*-*mldh*-*TrpsD* 的大小, 也说明在该阳性菌落的质粒中已插入 *mldh* 片段。同时, 以阳性菌落的质粒 DNA 为模板, *PrpsD*_F 和 *TrpsD*_R 为上下游引物, 进行 PCR 扩增, 电泳检测结果如图 1B 所示, PCR 产物为 1.9 kb, 这进一步证明质粒 pHY300plk-*PrpsD*-*TrpsD* 中已插入 *mldh* 片段。

由于采用单酶切进行连接, 需进行正反接验证, 查阅基因序列, 片段上酶切位点均有限制, 因此通过测定 *PrpsD*-*mldh*-*TrpsD* 基因序列间接验证 *mldh* 片段连接的正确与否。提取质粒 pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD*, 测定该质粒上 *PrpsD*-*mldh*-*TrpsD* 基因

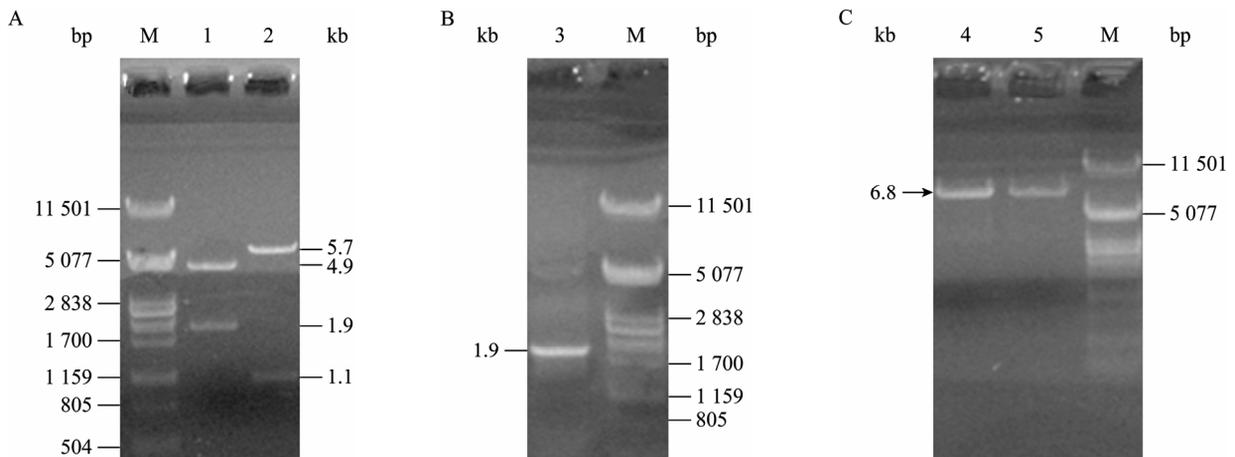


图1 重组质粒 pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD* 的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Detection of recombinant plasmid pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD* by agarose gel electrophoresis. (A) Restriction enzyme analysis of plasmid pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*. (B) PCR analysis of plasmid pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*. (C) Restriction enzyme analysis of plasmid pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD* from recombinant *B. subtilis* Wb600. M: λ /*Pst* I DNA marker; 1: pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*/*Sal* I/*Bgl* II; 2: pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*/*Bam* H I; 3: PCR amplification of *PrpsD-mldh-TrpsD* from plasmid pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*; 4: pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*/*Sal* I; 5: plasmid from recombinant *B. subtilis*/*Sal* I.

片段的核酸序列, 序列测定结果显示该 *PrpsD* 和 *TrpsD* 序列与已报道的枯草芽胞杆菌 168 菌株 *rpsD* 基因的启动子和终止子的基因序列一致, 同时 *mldh* 片段的连接为正向, 说明该质粒已成功地正确连接上 *PrpsD*、*mldh* 和 *TrpsD* 片段。

2.3 重组菌 *B. subtilis* Wb600(pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*) 的鉴定

2.3.1 质粒的检测

提取阳性菌落的质粒 DNA, *Sal* I 酶切后电泳检测, 结果如图 1C 所示, 枯草芽胞杆菌重组子中含有与原转化所用质粒大小一致的质粒, 初步认为该阳性重组子中已转入重组质粒 pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*。

2.3.2 SDS-PAGE 检测

取重组菌菌体破碎液进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2 所示, 重组菌 *B. subtilis* Wb600 (pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*) 细胞中有相对分子质量约为 42.5 kDa 的蛋白得以表达。根据本研究室前期文献 [7] 报道羧基还原酶的相对分子质量为 42.5 kDa, 这说明重组枯草芽胞杆菌能表达羧基还原酶。

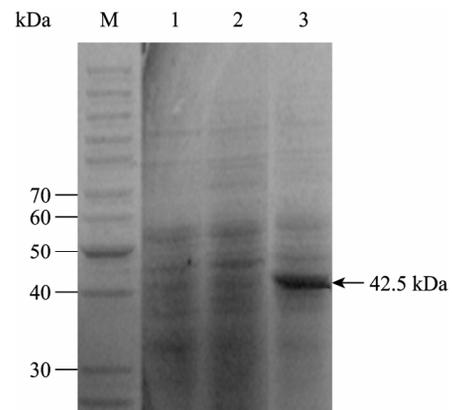


图2 枯草芽胞杆菌 Wb600 及其重组菌 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 Detection of *B. subtilis* Wb600 and its recombinant strain by SDS-PAGE. 1: cell crude extract of *B. subtilis* Wb600; 2: cell crude extract of *B. subtilis* Wb600 (pHY300plk); 3: cell crude extract of *B. subtilis* Wb600 (pHY300plk-*PrpsD-mldh-TrpsD*); M: standard protein molecular weight marker.

2.3.3 生物转化反应及检测

取重组菌菌体破碎液进行生物转化反应, 反应结束后取上清液进行 HPLC 和 UPLC-MS 检测产物。HPLC 检测结果如图 3 所示, 从图中可以看出, 在重组菌转化液色谱图中有保留时间分别为 29.23 min 和 31.43 min 的峰, 对照标样图谱, 这两个峰分别对

应 MAK 和 *d*-伪麻黄碱, 初步判断重组菌的生物转化液中含有 *d*-伪麻黄碱。而 33.8 min 的峰在添加与不添加 MAK 的转化反应液中都会产生, 该物质并非转化反应的副产物, 而可能是细胞本身产生的某种物质。对其进行 UPLC-MS 分析, 初步得出其分子量为 227.2, 但仍未能确定是何种物质, 有待进一步的研究。

为进一步确定转化产物, 采用超高效液相色谱-质谱联用法(UPLC-MS)对转化液进行分析, 测定转化产物的分子量, 结果如图 4 所示。其中图 A、B、C 分别为 MAK、*l*-麻黄碱和 *d*-伪麻黄碱标准溶液的选择离子色谱-质谱图。从 MAK、*l*-麻黄碱和 *d*-伪麻黄碱的选择离子色谱-质谱图中, 可以得到各自的母

离子[M+H]⁺分别为 164、166 和 166; 同时在选择各自的特征离子 (146、148 和 148) 下, 色谱图相应位置处分别有最大响应值, 保留时间分别为 3.56 min、7.85 min、7.98 min。通过标准溶液的液相色谱保留时间和质谱图可以用来确定转化液中的物质。图 D 为重组菌转化液的选择离子色谱-质谱图。从图中可以看出, 在同时选择特征离子 146 和 148 下, 重组菌转化液中在保留时间分别为 3.52 min 和 7.96 min 处有最大响应值, 对照标样图谱, 这两个峰分别对应 MAK 和 *d*-伪麻黄碱的峰, 同时根据这两个峰的质谱图可知其对应的分子量分别为 163(164-1) 和 165(166-1), 即为 MAK 和麻黄碱的分子量大小, 因而可以判断重组菌的转化液中含有 *d*-伪麻黄碱。

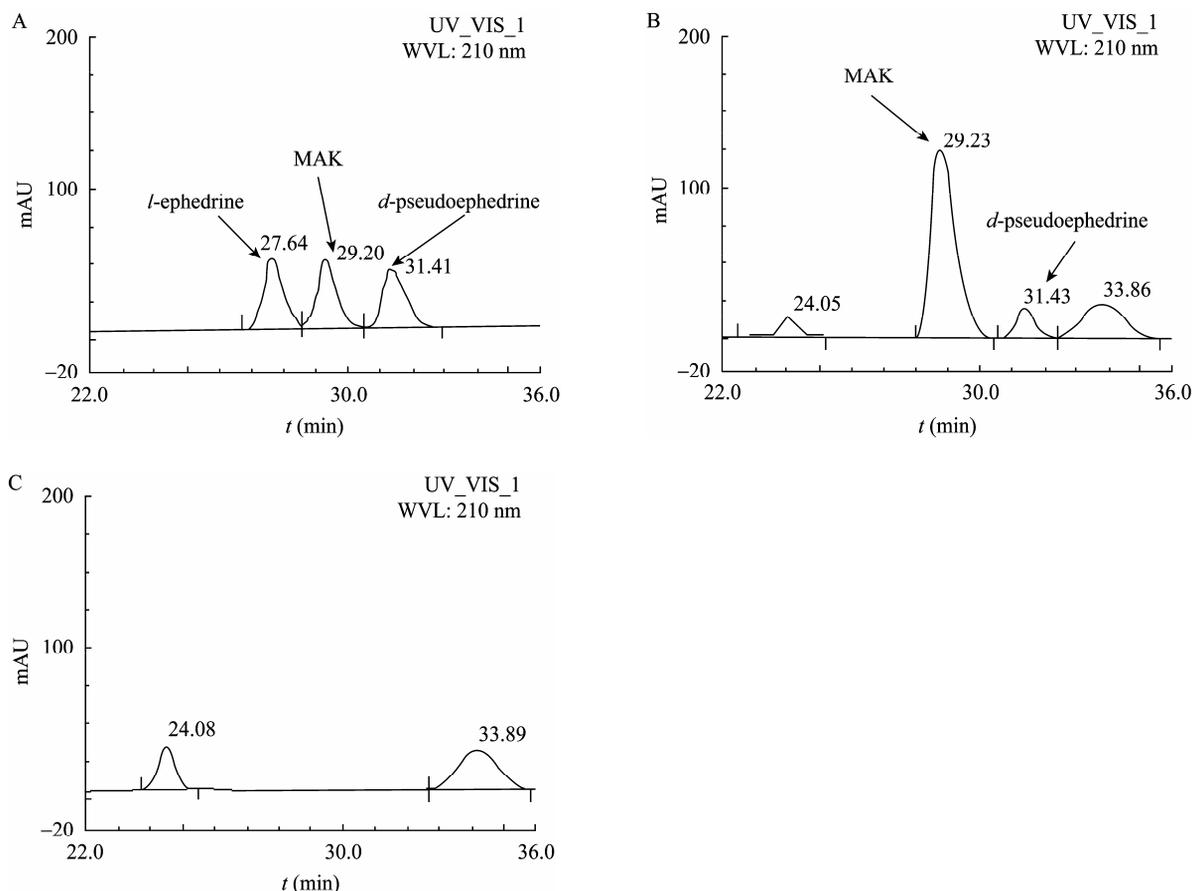


图 3 标样和重组菌转化液的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of the transformation products and the standard sample. (A) HPLC chromatogram of the standard sample (*l*-ephedrine, MAK and *d*-pseudoephedrine). (B) HPLC chromatogram of the transformation products in the presence of MAK from recombinant *B. subtilis*. (C) HPLC chromatogram of the transformation products in the absence of MAK from recombinant *B. subtilis*.

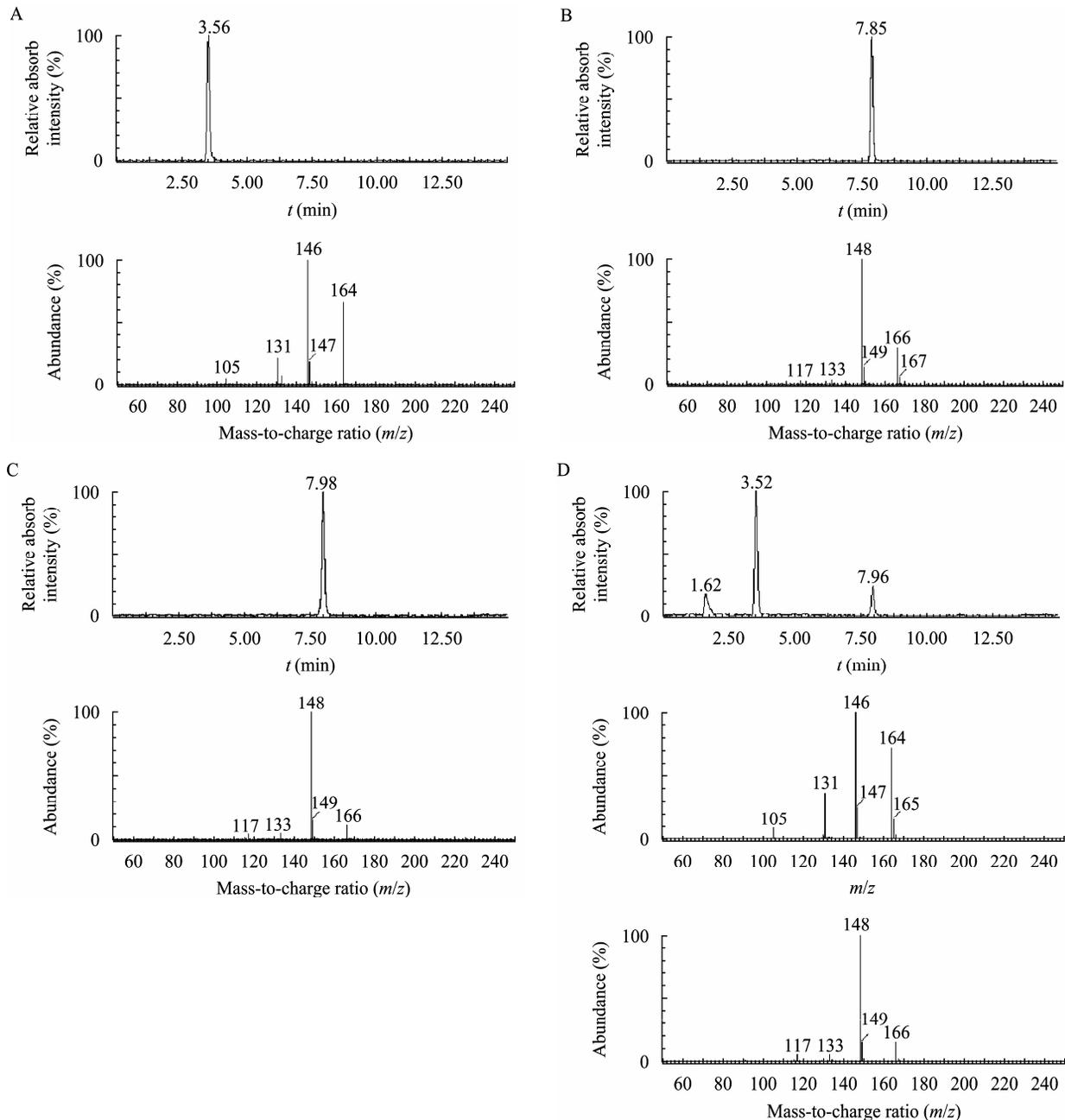


图 4 标样和重组菌转化液的选择离子色谱-质谱图

Fig. 4 Selected ion chromatogram and mass spectrometry of the transformation products from recombinant *B. subtilis* and the standard sample. (A) Selected ion chromatogram (m/z 146) and mass spectrometry of MAK. (B) Selected ion chromatogram (m/z 148) and mass spectrometry of *l*-ephedrine. (C) Selected ion chromatogram (m/z 148) and mass spectrometry of *d*-pseudoephedrine. (D) Selected ion chromatogram (m/z 146+148) and mass spectrometry of the transformation products from recombinant *B. subtilis*.

2.4 重组菌 *B. subtilis* Wb600(pHY300plk-*PrpsD*-*mldh*-*TrpsD*) 全细胞不对称还原反应

2.4.1 菌体用量对重组菌全细胞生物转化的影响

分别取培养时间为 12 h 的不同量重组菌湿菌体，

加入 9 mg 葡萄糖和 0.05 mg 的 MAK 转化反应，HPLC 分析测定，结果如图 5 所示。增加菌体用量，产物的产量会有不同程度的增长，其中以菌体量从 0.1 g 增加到 0.2 g 时增长幅度最大，而当菌体量大

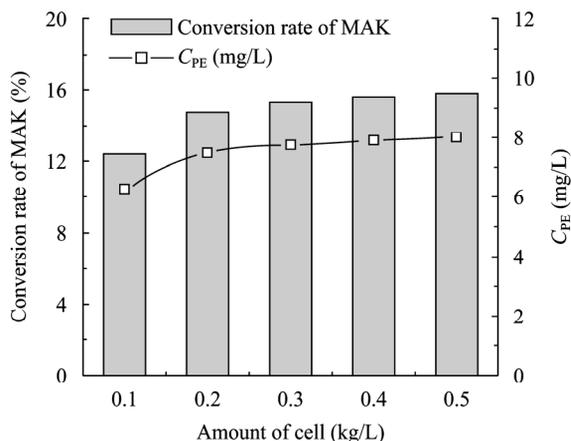


图5 菌体用量对全细胞生物转化的影响

Fig. 5 Effect of the amount of cell on whole-cell biotransformation.

于 0.2 g 时, 产物产量趋于稳定, 这与本研究室前期研究结果相一致^[6], 故选择 0.2 g 作为后续转化反应的菌体加入量。

2.4.2 葡萄糖浓度对重组菌全细胞生物转化的影响

取 0.2 g 培养时间为 12 h 的重组菌湿菌体, 加入 0.05 mg MAK 和不同量的葡萄糖转化反应, HPLC 分析测定, 结果如图 6 所示。在糖浓度为 18 g/L 时产物的产量最高。当糖浓度低于 18 g/L 时, 产物的量随糖浓度的升高而增加; 而当糖浓度超过 18 g/L 后, 由于高浓度的葡萄糖抑制 GDH 的酶活, 辅酶 NADH 生成较少, 最终导致随着糖浓度的继续增高产物产量反而降低。

2.4.3 底物 MAK 浓度对重组菌全细胞生物转化的影响

取 0.2 g 培养时间为 12 h 的重组菌湿菌体, 加入 18 mg 的葡萄糖和不同量的 MAK 转化反应, HPLC 分析测定, 结果如图 7 所示。底物 MAK 在加入浓度为 0.4 g/L 时产物的产量最高。当 MAK 浓度低于 0.4 g/L 时, 随着底物浓度的增加随之增加; 而当 MAK 浓度高于 0.4 g/L 时, 由于在高浓度 MAK 下存在底物抑制作用, 酶活降低, 产物产量随着底物浓度的增加反而降低。

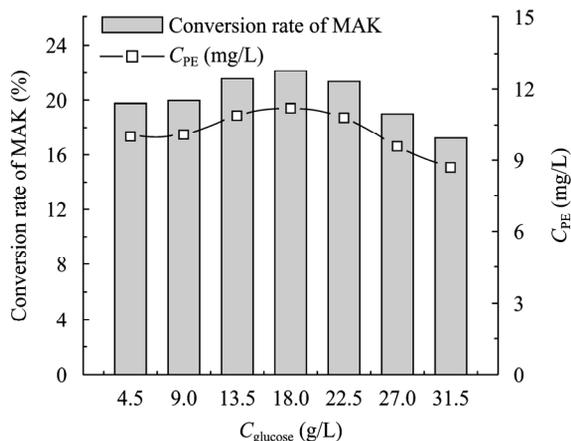


图6 葡萄糖浓度对全细胞生物转化的影响

Fig. 6 Effect of the concentration of glucose on whole-cell biotransformation.

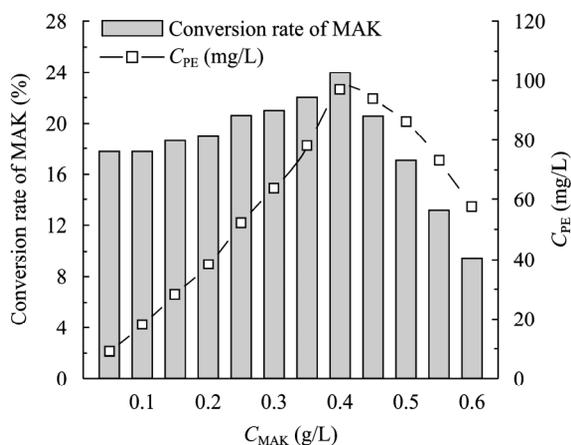


图7 底物 MAK 浓度对全细胞生物转化的影响

Fig. 7 Effect of the concentration of MAK on whole-cell biotransformation.

2.4.4 培养时间对重组菌全细胞生物转化的影响

取 0.2 g 不同培养时间的重组菌湿菌体, 加入 18 mg 的葡萄糖和 0.4 mg 的 MAK 转化反应, HPLC 分析测定, 结果如图 8 所示。不同培养时间下, 培养 12 h 其转化生成 *d*-伪麻黄碱的产量最高。不同时间收集的菌体, 细胞所处的生长周期不同, 因而外源基因的表达量不同, 进而影响到产物的产量。培养时间不够外源基因得不到充分表达, 产物产量低; 过长的培养时间则会导致细胞衰亡并产生大量毒素和次产物导致酶活力下降而限制产量。

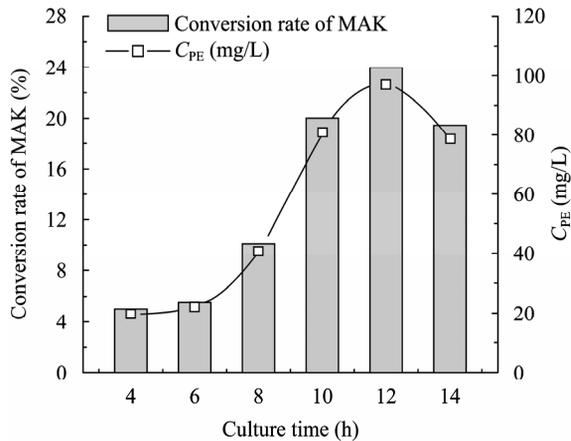


图8 细胞培养时间对全细胞生物转化的影响

Fig. 8 Effect of culture time on whole-cell biotransformation.

2.4.5 较优条件下重组菌全细胞生物转化

取 0.2 g 培养时间为 12 h 的重组菌湿菌体, 加入 18 mg 的葡萄糖和 0.4 mg 的 MAK 转化反应, HPLC 分析测定 *d*-伪麻黄碱的产量为 97.5 mg/L, 底物摩尔转化率为 24.1%。

3 讨论

近些年, 麻黄碱和伪麻黄碱不仅用于多种药物制剂, 在国外还用于营养食品补充剂、减肥剂等, 应用领域广泛, 市场活跃。利用生物转化同时酶耦联再生辅酶的方法制备麻黄碱是大规模生产麻黄碱的理想途径之一, 具有巨大发展潜力。枯草芽胞杆菌作为目前原核表达系统中较理想的宿主, 生理、生化、遗传及分子生物学研究背景良好, 与大肠杆菌表达系统相比具有以下特点: 非致病性; 密码子偏好型不明显, 转录翻译机制清楚^[15]; 虽表达水平低, 但避免了蛋白质的错误折叠或不完全合成和易形成包涵体的缺点^[16]。近年来, 随着分子生物学和基因工程的发展, 枯草芽胞杆菌作为基因工程表达系统发展迅速, 并展现出良好的应用前景。

本文首次报道了利用 *B. subtilis* 生物转化生产 *d*-伪麻黄碱, 重组 *B. subtilis* 在葡萄糖存在的情况下能够催化底物 MAK 转化生成 *d*-伪麻黄碱。研究选

择 *B. subtilis* Wb600 作为宿主, 利用强启动子 *PrpsD* 和终止子 *TrpsD* 实现 *mldh* 在枯草芽胞杆菌中的高效表达, 同时通过细胞内 GDH 解决辅酶的再生问题。对重组菌进行全细胞转化反应实验, 产物产量最高为 97.5 mg/L, 底物摩尔转化率为 24.1%, 成功实现了目标酶的生物转化功能, 避免了昂贵的辅酶外源性的加入, 大大降低了产物的制备成本。

本研究室前期研究中, 利用 *M. morgani* 催化 MAK 生产 *d*-伪麻黄碱, 通过外加辅酶, 由于辅酶提供充足, 最终产物产量为 85.2 mg/L, 摩尔转化率达 84.4%^[6]; 而利用共表达 *mldh* 和 *gdh* 的重组大肠杆菌不对称还原产 *d*-伪麻黄碱, 虽然实现了辅酶在细胞内的再生, 但由于本身 MLDH 酶活力不高且再生的辅酶未能完全替代外加辅酶的作用, 结果最终产物产量和摩尔转化率均不是很高, 分别为 58 mg/L 和 57.6%^[8]; 相比之下, 本研究中产物产量稍有提高, 但底物摩尔转化率较低。从文中葡萄糖浓度对转化的影响可知, 在一定浓度范围内产物的量随糖浓度的升高而增加, 但增长幅度并不大, 初步判断可能是由于转化反应过程中 GDH 酶活力不高, 虽增加葡萄糖浓度, 但辅酶仍提供不足, 导致最终产物产量相差不大。此外, 相比外加辅酶, 通过葡萄糖脱氢酶实现辅酶的再生, 其在氧化葡萄糖生成辅酶的同时也存在葡萄糖酸的产生, 而葡萄糖酸的产生会影响反应体系的 pH, 导致反应未能在较适的 pH 条件下进行, 最终影响产物的产量。本研究虽然实现了 *mldh* 基因在枯草芽胞杆菌中的高效表达, 在不外加辅酶的情况下可以转化生产麻黄碱, 但仍未能较好地解决转化过程中辅酶的需求问题, 后续可以进一步考察增加 GDH 拷贝数或更改 MLDH 与 GDH 两者之间的比例关系从而提高产物的产量; 或通过筛选自身 GDH 酶活力较高的野生型菌株, 以其为宿主表达羧基还原酶基因实现产物的高产。这些研究对于工业应用重组枯草芽胞杆菌生物转化生产 *d*-伪麻黄碱具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Zhang L, Ding ZY, Shi GY. Asymmetric biosynthesis of (1*S*,2*S*)-ephedrine by *Morganella morganii* CMCC(B) 49208. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8(4): 694–698.
- [2] Krizevski R, Bar E, Shalit O, et al. Composition and stereochemistry of ephedrine alkaloids accumulation in *Ephedra sinica* Stapf. *Phytochemistry*, 2010, 71(8/9): 895–903.
- [3] Rothman RB, Vu N, Partilla JS, et al. *In vitro* characterization of ephedrine related stereoisomers at biogenic amine transporters and the receptorome reveals selective actions as norepinephrine transporter substrates. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(1): 138–145.
- [4] Chen P, Wang JH. Discussion about reformation of ephedrine production technology. *Environ Protect Xinjiang*, 2002, 24(3): 25–27.
陈平, 王江红. 麻黄碱生产工艺改进分析. *新疆环境保护*, 2002, 24(3): 25–27.
- [5] Yoshihiko Y. Application of biotransformation in the chiral industry: oxido-reductases reaction. *Biosci Ind*, 2005, 63(5): 308–311.
- [6] Dong SJ, Shi GY, Lu Y, et al. Microbial transformation for *d*-pseudo-ephedrine by *Morganella morganii*. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2004, 23(2): 5–7.
董世建, 石贵阳, 卢燕, 等. 微生物转化法生产 *d*-伪麻黄碱. *无锡轻工大学学报*, 2004, 23(2): 5–7.
- [7] Zhang PH, Zhang L, Lu Y, et al. Purification and characterization of carbonyl enantioselective reductase from *Morganella morganii* J-8. *Chin J Biotech*, 2007, 23(2): 268–272.
张鹏华, 张梁, 卢燕, 等. *Morganella morganii* J-8 羰基不对称还原酶的分离纯化及性质研究. *生物工程学报*, 2007, 23(2): 268–272.
- [8] Yuwen WG. Study on asymmetric carbonyl reduction of prochiral aromatic ketone to *d*-pseudoephedrine by co-expression recombinant *Escherichia coli* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.
宇文伟刚. 共表达型重组大肠杆菌不对称还原产 *d*-伪麻黄碱的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [9] Yun H, Choi HL, Fadnavis NW, et al. Stereospecific synthesis of (R)-2-hydroxy carboxylic acids using recombinant *E. coli* BL21 overexpressing *YiaE* from *Escherichia coli* K12 and glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Progr*, 2005, 21(2): 366–371.
- [10] Xu ZN, Jing KJ, Liu Y, et al. High level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34(1): 83–90.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [12] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons Inc, 2002: 56–80.
- [13] Heng C, Chen ZJ, Du LX, et al. Expression and secretion of an acid-stable α -amylase gene in *Bacillus subtilis* by *SacB* promoter and signal peptide. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(21): 1731–1737.
- [14] Wang JZ, Fan M. *Protein Technical Manual*. Beijing: Science Press, 2001: 77–101.
汪家政, 范明. *蛋白质技术手册*. 北京: 科学出版社, 2001: 77–101.
- [15] Le ATT, Schumann W. A novel cold-inducible expression system for *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(2): 264–269.
- [16] Zweers JC, Barák I, Becher D, et al. Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microb Cell Fact*, 2008, 7: 10–29.