

PPK 和 GMAS 共表达重组菌株的构建及其在 L-茶氨酸合成中的应用

李元*, 刘珊*, 祝俊

中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

李元, 刘珊, 祝俊. PPK 和 GMAS 共表达重组菌株的构建及其在 L-茶氨酸合成中的应用. 生物工程学报, 2016, 32(12): 1745-1749.

Li Y, Liu S, Zhu J. Construction of recombinant strains co-expressing PPK and GMAS for the synthesis of L-theanine. Chin J Biotech, 2016, 32(12): 1745-1749.

摘要: 构建了共表达 ATP 再生和 L-茶氨酸合成酶的重组大肠杆菌菌株, 并将其应用于 L-茶氨酸的合成中。合成多聚磷酸盐激酶 (PPK) 和 γ -谷氨酰甲胺合成酶 (GMAS) 基因序列, 分别利用 pETDuet-1 和 pET-21a(+) 载体, 构建共表达重组质粒 pETDuet-ppk+gmas 和 pET21a-ppk+gmas。将上述两种重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 获得重组菌株 TPG 和 APG。IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 结果表明, PPK 和 GMAS 在两种重组菌中均可溶性表达。当用于催化 L-茶氨酸合成时, 来自 APG 的 GMAS-PPK 要优于 TPG。利用 APG 所产的酶进行 L-茶氨酸合成, 在 37 °C、pH 7.0 条件下, 使用催化量 ATP 可实现 L-茶氨酸的摩尔产率为 86.0%。该结果一方面扩展了酶法 ATP 再生系统的应用, 另一方面为生物催化合成 L-茶氨酸提供了一种有效方法。

关键词: ATP 再生, γ -谷氨酰甲胺合成酶, 多聚磷酸盐激酶, L-茶氨酸, 共表达, 双酶偶联

Construction of recombinant strains co-expressing PPK and GMAS for the synthesis of L-theanine

Yuan Li*, Shan Liu*, and Jun Zhu

Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Recombinant strains expressing enzymes for ATP regeneration and L-theanine production were constructed and used for the synthesis of L-theanine. The *ppk* gene encoding polyphosphate kinase (PPK) from *Rhodobacter sphaeroides* and *gmas* gene encoding γ -glutamylmethylamide synthetase (GMAS) from *Methylovorus mays* were synthesized, and two recombinant plasmids, pETDuet-ppk+gmas and pET21a-ppk+gmas were constructed for co-expression of PPK and GMAS in *Escherichia coli* BL21(DE3). SDS-PAGE analysis showed that PPK and GMAS were overexpressed in soluble form in both recombinant strains. GMAS-PPK obtained from the recombinant strain containing pET21a-ppk+gmas was more efficient to synthesize L-theanine. After 24 h at 37 °C and pH at 7.0, 86.0% yield of L-theanine was achieved with catalytic amount of ATP. This study extends the application of enzymatic ATP regeneration system. In addition, it provides an efficient method for the biosynthesis of L-theanine.

Keywords: ATP regeneration, γ -glutamylmethylamide synthetase, polyphosphate kinase, L-theanine, co-expression, dual-enzyme coupled reaction

腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 是一种高能磷酸化合物, 是生物体内最直接的能量来源。在工业中,

ATP 常常用于生物合成酶催化生产高附加值化学品的反应中。由于 ATP 价格昂贵, 直接在反应过程中

Received: June 2, 2016; Accepted: July 8, 2016

Supported by: Science and Technology Projects of Tianjin (No. 14ZCZDSY00064).

Corresponding author: Jun Zhu. Tel/Fax: +86-22-24828771; E-mail: zhu_j@tib.cas.cn

*These authors contributed equally to this study.

天津市科技计划项目 (No. 14ZCZDSY00064) 资助。

添加 ATP 从经济角度考虑是不允许的。因此, ATP 再生系统^[1]是提高生物合成酶反应经济性的一个有效措施。文献已报道多种酶可以用于 ATP 再生, 例如, 丙酮酸激酶、乙酸激酶和多聚磷酸盐激酶 (PPK) 等^[2]。其中, PPK 由于其底物多聚磷酸盐 (polyP) 廉价易得^[3], 广泛应用于 ATP 再生。基于 PPK 的 ATP 再生系统已用于多种高附加值化学品的合成, 如 D-氨基酸二肽^[4]、甘油三磷酸^[5]和 D-木酮糖-5-磷酸^[6]等。

L-茶氨酸是一种茶叶中的游离氨基酸, 决定茶叶的风味和品质。其具有放松减压、提高学习能力和抗肿瘤等多种重要的生理功能^[7], 因此广泛应用于食品、保健品及医药行业。 γ -谷氨酰甲胺合成酶 (GMAS) 由于其对乙胺的高活性, 可用于 L-茶氨酸的合成^[8-9]。然而, 该反应需要 ATP 的参与。因此, 本研究构建了共表达 PPK 和 GMAS 的重组菌株, 并将其应用于 L-茶氨酸的合成, 路线如图 1 所示。通过共表达 PPK 和 GMAS, 有效实现了基于 PPK 的 ATP 再生系统在合成 L-茶氨酸中的应用, 也为 L-茶氨酸的生物合成提供了新的有效途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒与菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top10、BL21 (DE3) 与表达载体 pETDuet-1、pET-21a(+) 为本实验室保存。

1.1.2 试剂

限制性内切酶购于 Thermo 公司; *Taq* DNA 聚合酶、Primer STARTM DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司; L-茶氨酸和 γ -谷氨酰羟脂肪酸标准品购于 Sigma-Aldrich 公司; ATP 和 ADP 购于北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 共表达重组载体的构建

编码 PPK 的基因 *ppk* (来源于类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides*, GenBank 登录号: GZ485151) 委托华大基因合成, 并进行密码子优化以适合在

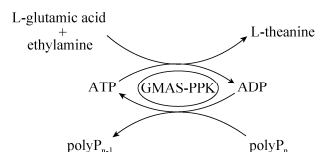


图 1 偶联 ATP 再生酶法合成 L-茶氨酸
Fig. 1 Enzymatic synthesis of L-theanine coupled with ATP regeneration.

E. coli 中外源表达。基因的两端分别添加 *Nco* I 和 *Sal* I 酶切位点。用 *Nco* I /*Sal* I 双酶切, 将胶回收后的基因片段与同样酶切的 pETDuet-1 连接, 构建重组质粒 pETDuet-*ppk*。编码 GMAS 的基因 *gmas* (来源于噬甲基菌 *Methylovorus mays*, GenBank 登录号: AB333782) 同样由华大基因合成并进行密码子优化, 基因两端分别添加 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。用 *Nde* I /*Xho* I 双酶切后克隆入 pETDuet-*ppk* 中, 构建共表达质粒 pETDuet-*ppk*+*gmas*。

以 pETDuet-*ppk* 为模板, 使用引物 PPK-F 和 PPK-R (表 1) 扩增 *ppk* 基因, PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 45 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经纯化并用 *Nde* I /*Sal* I 双酶切后克隆入 pET-21a (+) 中以构建重组质粒 pET21a-*ppk*。使用引物 GMAS-F 和 GMAS-R (表 1), 从 pETDuet-*ppk*+*gmas* 扩增 *gmas* 基因, PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 45 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。用 *Hind* III 消化后, 将 *gmas* 基因片段插入 pET21a-*ppk* 中 *ppk* 基因的下游, 构建共表达质粒 pET21a-*ppk*+*gmas*。

1.2.2 重组蛋白的诱导及酶活测定

将构建成功的共表达质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 挑取转化子接种到含有 100 mg/L 氨基青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。过夜培养物以 1% 的接种量转接入另一摇瓶中培养至 $OD_{600}=0.6-0.8$, 加入 IPTG 诱导过夜, SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白表达情况。

诱导完成后 8 000 r/min 离心收集菌体, 用无菌水洗涤一次, 按 10 mL/g 湿菌体的比例加入 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 8.0) 重悬, 超声破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。将上清液冻干, 获得重组蛋白的粗酶粉并进行酶活测定, GMAS 和 PPK 的酶活测定方法分别参照文献^[8]和^[4]。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')
PPK-F	GGAATTCC <u>CATATG</u> GCCGAAGATCGTGCTATGC (the underline indicates <i>Nde</i> I)
PPK-R	ACGCGT <u>CGACTCA</u> ACCTTGACGCGGTTTAC (the underline indicates <i>Sal</i> I)
GMAS-F	CCC <u>AAGCTT</u> AAGGAGATATAATGAAGAGCCTG GAAGAAGCAC (the underline indicates <i>Hind</i> III)
GMAS-R	CCC <u>AAGCTT</u> TCAGTAGAATTGAACATAGCGGTG (the underline indicates <i>Hind</i> III)

The underlined sequences indicates restriction enzyme site

1.2.3 双酶共表达合成 L-茶氨酸

标准反应体系：200 mmol/L 谷氨酸钠、200 mmol/L 乙胺盐酸盐、5 mmol/L ATP、150 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、75 mmol/L 六偏磷酸钠和 10 mL 咪唑缓冲液 (75 mmol/L, pH 8.0)。用 5 mol/L NaOH 调节反应 pH 至 7.0, 加入 5 g/L GMAS-PPK 粗酶粉, 于 30 °C 反应。

1.2.4 HPLC 测定 L-茶氨酸含量

反应产物 L-茶氨酸使用 HPLC 检测。HPLC 检测条件：色谱柱为 Astec chirobiotic® TAG (250 mm×4.6 mm×5 μm), 柱温 30 °C, 以醋酸铵缓冲液 (5 mmol/L, pH 6.0) 与甲醇 (25/75, V/V) 为流动相, 流速为 0.8 mL/min, 等梯度洗脱, 紫外检测器, 检测波长为 215 nm, 进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 共表达质粒 pETDuet-ppk+gmas 的构建

将合成的 *ppk* 基因插入 pETDuet-1 载体的第一个多克隆位点, 得到重组质粒 pETDuet-ppk。Nco I / Sal I 双酶切鉴定, 结果如图 2A 所示, 酶切产生分子量与 *ppk* 基因大小一致的条带。合成的 *gmas* 基因插入 pETDuet-ppk 中的第 2 个多克隆位点, 获得 PPK 与 GMAS 的共表达质粒 pETDuet-ppk+gmas, 其中每个基因处于独立的 T7 启动子控制下。用 Nco I / Sal I / Xho I 三酶切鉴定重组质粒, 酶切结果见图 2B。酶切产生三条带, 分子量最小的为 *ppk* 片段, 分子量约 1 500 bp 的为含有 T7 启动子的 *gmas* 片段。经酶切鉴定的重组质粒由华大基因进行测序, 测序结果与合成序列一致, 表明构建成功。

2.2 共表达质粒 pET21a-ppk+gmas 的构建

用末端分别含有 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切位点的引物扩增 *ppk* 基因, 并插入 pET-21a(+) 中, 得到重组质粒 pET21a-ppk, *Nde* I / *Sal* I 双酶切鉴定, 结果如图 3A 所示, 其中分子量较小的条带为 *ppk* 基因。PCR 扩增 *gmas* 基因, 其中在 5'引物的上游序列中添加核糖体结合位点序列。将得到的 *gmas* 片段插入 *ppk* 的下游, 获得另一共表达质粒 pET21a-ppk+gmas, 其中 *ppk* 与 *gmas* 基因处于同一启动子控制下。用 *Nde* I / *Hind* III 双酶切鉴定重组质粒, 酶切结果见图 3B。除载体条带外, 酶切产生另外两条较小的带, 其分子量分别与 *gmas* 和 *ppk* 基因大小相符。经酶切鉴定的重组质粒同样进行测序验证, 经比对无突变, 表明构建成功。

2.3 重组蛋白的表达及酶活测定

将两种共表达重组质粒 pETDuet-ppk+gmas 和 pET21a-ppk+gmas 分别转入 BL21 (DE3) 中, 得到重

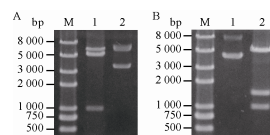


图2 重组质粒 pETDuet-ppk (A) 和 pETDuet-ppk+gmas (B) 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids. (A) Identification of pETDuet-ppk. M: DNA marker; 1: digestion of plasmid pETDuet-ppk by *Nco* I / *Sal* I; 2: recombinant plasmid pETDuet-ppk. (B) Identification of pETDuet-ppk+gmas. M: DNA marker; 1: recombinant plasmid pETDuet-ppk+gmas; 2: digestion of plasmid pETDuet-ppk+gmas by *Nco* I / *Sal* I / *Xho* I.

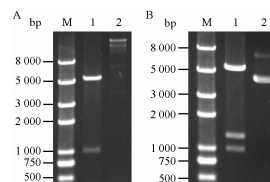


图3 重组质粒 pET21a-ppk (A) 和 pET21a-ppk+gmas (B) 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids. (A) Identification of pET21a-ppk. M: DNA marker; 1: digestion of plasmid pET21a-ppk by *Nde* I / *Sal* I; 2: recombinant plasmid pET21a-ppk. (B) Identification of pET21a-ppk+gmas. M: DNA marker; 1: digestion of plasmid pET21a-ppk+gmas by *Nde* I / *Hind* III; 2: recombinant plasmid pET21a-ppk+gmas.

组菌株 TPG 和 APG。将 TPG 和 APG 分别用终浓度 0.05、0.1、0.2、0.5 和 1.0 mmol/L 的 IPTG 于 20 °C 诱导过夜, 电泳检测蛋白表达。结果表明诱导后 GMAS 和 PPK 在两个重组菌株中均成功过表达, 并且大部分目的蛋白存在于上清液中; 对于各个 IPTG 诱导浓度, 蛋白的表达水平无明显差异。其中, 在 TPG 的表达产物中, 存在大量 GMAS, 但仅微量的 PPK; 与 TPG 相比, APG 中 GMAS 的表达量明显降低, 而 PPK 的量增加。同时, 在 0.1 mmol/L IPTG 下考察了不同诱导温度 (20 °C、25 °C、30 °C 和 37 °C) 对目的蛋白表达的影响。结果表明 20 °C 时重组蛋白的可溶性表达最好。0.1 mmol/L IPTG 于 20 °C 诱导过夜后蛋白表达的 SDS-PAGE 检测结果见图 4。

用终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 20 °C 诱导过夜后, 离心收集 TPG 和 APG 菌体, 重悬后超声破碎。4 °C 离心细胞裂解液, 将上清冻干, 得到 GMAS-PPK 粗酶粉。对两种粗酶粉进行酶活测定, 从 TPG 和 APG 制备的 GMAS-PPK 粗酶粉的 GMAS 酶活分别为 1.25 U/mg 和 0.51 U/mg, PPK 酶活分别为 0.14 U/mg 和 0.34 U/mg。

2.4 共表达 GMAS-PPK 催化活性比较

使用相同量的来自 TPG 和 APG 的 GMAS-PPK 粗酶粉合成 L-茶氨酸, 结果如图 5 所示, 6.5 h 后

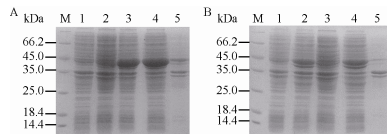


图4 TPG 和 APG 裂解物的 SDS-PAGE 分析 (A: TPG 表达产物; B: APG 表达产物)

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of the TPG and APG lysate. (A) TPG expression products. M: protein marker; 1: control of *E. coli* BL21(DE3) (pETDuet-1) after induction; 2: control of TPG which is not induced; 3: TPG after induction; 4: supernatant of TPG after induction; 5: precipitate of TPG after induction. (B) APG expression products. M: protein marker; 1: control of *E. coli* BL21(DE3) (pET-21a(+)) after induction; 2: APG after induction; 3: control of APG which is not induced; 4: supernatant of APG after induction; 5: precipitate of APG after induction.

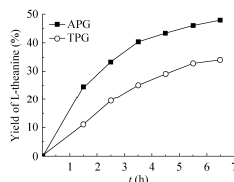


图5 来自 TPG 和 APG 的 GMAS-PPK 催化活性比较
Fig. 5 Comparison of catalytic activity of GMAS-PPK from TPG and APG. The reaction was carried out with the standard reaction using GMAS-PPK from TPG or APG. The concentration of L-theanine was determined by HPLC at different time.

L-茶氨酸的产率分别达到 34.1%和 47.9%。与 APG 相比,来自 TPG 的 GMAS-PPK 所催化反应的初始速率明显降低。因此,选用来自 APG 的 GMAS-PPK 进行 L-茶氨酸合成反应研究。

2.5 共表达 GMAS-PPK 用于合成 L-茶氨酸

使用来自 APG 的 GMAS-PPK 在不同温度下或不同 pH 下合成 L-茶氨酸,结果如图 6 所示。结果表明最适反应温度为 37 °C,最适反应 pH 为 7.0–7.5。

在上述最优反应温度和 pH 下,于 200 mL 反应体系中合成 L-茶氨酸。以 200 mmol/L L-谷氨酸钠和 200 mmol/L 乙胺盐酸盐为底物,偶联以六偏磷酸钠为磷酸供体的 ATP 再生体系,使用共表达的 GMAS-PPK 作催化剂,反应过程中使用 2 mol/L NaOH 将反应 pH 维持到 7.0,反应进程如图 7 所示。在最初 6 h 内,反应速度较快,随后反应速度变缓。在 24 h 后,L-茶氨酸的摩尔产率可达 86.0%,含量为 26.8 g/L。

3 讨论

在 ATP 作为能量供体的酶催化反应中,如何高效且低成本地提供 ATP 循环再生是需要解决的主要问题^[10]。本研究构建了共表达 PPK 和 GMAS 的重组菌株,并使用从其制备的 GMAS-PPK 粗酶粉催化

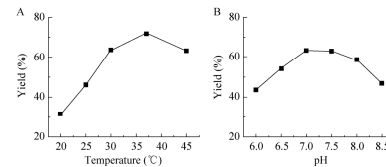


图6 温度和 pH 对 GMAS-PPK 催化合成 L-茶氨酸的影响 (A: 温度的影响; B: pH 的影响)

Fig. 6 Effect of temperature and pH on the production of L-theanine catalyzed by GMAS-PPK. The reaction was carried out with the standard reaction at various temperatures (A) and pHs (B). The concentration of L-theanine was determined by HPLC after 24 h.

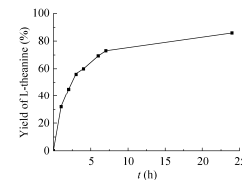


图7 双酶偶联合成 L-茶氨酸反应进程

Fig. 7 Time course of the dual-enzyme coupled synthesis of L-theanine.

反应,建立了一个双酶偶联的催化系统,可在催化量 ATP 的存在下实现 L-茶氨酸的高效合成。

在本研究中将 *gmas* 和 *ppk* 基因分别同时插入 pETDuet-1 和 pET-21a(+)中,获得两个共表达菌株 TPG 和 APG。在两个重组菌株中 GMAS 和 PPK 均成功地以可溶性形式表达。然而,在 TPG 的表达产物中 GMAS 的量远大于 PPK。在之前的研究中,当分别在 *E. coli* 中重组表达时,GMAS 的表达水平明显高于 PPK,说明 GMAS 可能更适应在 *E. coli* 中外源表达。因此,当 *gmas* 和 *ppk* 在各自独立的启动子控制下在 *E. coli* 中共表达时,宿主会优先合成 GMAS。而将 *gmas* 基因插入 pET21a-ppk 中与 *ppk* 共用一个启动子时,由于远离启动子,GMAS 的表达量大大降低,同时 PPK 的表达水平明显上升。相应地,TPG 中 GMAS 的活性比 APG 中高约 1 倍,而 PPK 活性比 APG 低 60%。由于 GMAS 与 PPK 活性的失调,当将来自 TPG 的 GMAS-PPK 用作催化剂时,ATP 再生成为限速步骤,导致其催化合成 L-茶氨酸的能力降低。这说明当共表达 PPK 和 GMAS 用于 L-茶氨酸合成时,重组菌株 APG 要优于 TPG。

当将来自 APG 的 GMAS-PPK 用于 L-茶氨酸合成时,最适反应温度为 37 °C,最适 pH 为 7.0–7.5,反应条件温和。在最适反应条件下,底物 L-谷氨酸钠浓度为 200 mmol/L 时,反应混合物中加入约为底物初始量四十分之一的 ATP 即可使 L-茶氨酸的转化率到达 85%以上;反应中 ATP 循环了约 35 次。因此,通过酶法 ATP 再生,反应体系中 ATP 的量大大降低。

除 PPK 之外,文献^[2]中还报道了基于丙酮酸激酶

或乙酸激酶的 ATP 再生系统。然而,丙酮酸激酶所用磷酸供体为磷酸烯醇式丙酮酸,其价格昂贵,不易保存;此外,产物丙酮酸累积后会对丙酮酸激酶产生抑制作用。乙酸激酶催化乙酰磷酸和 ADP 生成乙酸和 ATP,乙酰磷酸不易市售获得,因而限制了其在工业化生产中的使用。与之相比,本研究中使用稳定性好且价格便宜的六偏磷酸钠作为磷酸供体有效实现了 ATP 的再生,更有利于工业化生产应用。

在文献报道的利用 L-谷氨酰胺酶 (GLS)^[11-12]和 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT)^[13-16]催化合成 L-茶氨酸的反应体系中,需要以价格较昂贵的 L-谷氨酰胺 (70-100 元/kg)为底物,还需要添加大大过量的乙胺 (多达 10 倍) 防止 L-谷氨酰胺水解。另外,此类反

应体系一般是在碱性条件下进行,在工业生产中会增加设备维护的成本。相比之下,虽然本研究中需要添加少量 ATP (5 mmol/L),但是该反应以廉价的 L-谷氨酸钠 (15-30 元/kg) 为原料,无需考虑 L-谷氨酰胺水解带来的副产物问题。另外,反应中只需要等当量的乙胺盐酸盐,大大降低了其用量。此外,该反应在中性条件下进行,为工业化生产提供了便利条件。有关 L-茶氨酸酶法合成途径的具体参数见表 2。

为了提高该双酶偶联系统的催化效率,需要进一步改造 GMAS 和 PPK,以期提高两种酶在同一菌株中的表达量和酶活,并进一步增加合成 L-茶氨酸的底物浓度和产率。

表 2 酶法合成 L-茶氨酸方法的比较

Table 2 Comparison of production conditions and yields with enzymes used in L-theanine production.

Enzyme	Strain for enzyme source	Enzyme dosage (U/mL)	Substrates		Conditions	t (h)	Yield (%)	Reference
			γ -Glutamyl donor used (mol/L)	Ethylamine (mol/L)				
GLS	<i>P. nitroreducens</i>	0.5	L-Glutamine, 0.7	1.5	pH 11.0, 30 °C	7	39	[11]
	<i>P. nitroreducens</i>	0.3	L-Glutamine, 0.3	1.5	pH 10.0, 37 °C	5	40	[12]
	<i>E. coli</i>	0.4	L-Glutamine, 0.2	1.5	pH 10.0, 37 °C	2	60	[13]
GGT	<i>E. coli</i>	1.5	L-Glutamine, 0.267	2.0	pH 10.5, 37 °C	24	80	[14]
	<i>B. subtilis</i>	2.0	L-Glutamine, 0.2	2.2	pH 10.0, 37 °C	5	78	[15]
	<i>B. licheniformis</i>	1.0	L-Glutamine, 0.08	0.6	pH 9.0, 37 °C	4	84	[16]
GMAS	<i>M. lysis</i>	2.5	L-Glutamic acid, 0.2	0.2	pH 7.0, 37 °C	24	86	This work

REFERENCES

- [1] Langer RS, Hamilton BK, Gardner CR, et al. Enzymatic regeneration of ATP. I. alternative routes. *AIChE J*, 1976, 22(6): 1079-1090.
- [2] Andexer JN, Richter M. Emerging enzymes for ATP regeneration in biocatalytic processes. *ChemBioChem*, 2015, 16(3): 380-386.
- [3] Shiba T, Tsutsumi K, Ishige K, et al. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry*, 2000, 65(3): 315-323.
- [4] Sato M, Masuda Y, Kirimura K, et al. Thermostable ATP regeneration system using polyphosphate kinase from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 for D-amino acid dipeptide synthesis. *J Biosci Bioeng*, 2007, 103(2): 179-184.
- [5] Restiawaty E, Iwasa Y, Maya S, et al. Feasibility of thermophilic adenosine triphosphate-regeneration system using *Thermus thermophilus* polyphosphate kinase. *Process Biochem*, 2011, 46(9): 1747-1752.
- [6] Kim JE, Zhang YHP. Biosynthesis of D-xylulose 5-phosphate from D-xylose and polyphosphate through a minimized two-enzyme cascade. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(2): 275-282.
- [7] Mu WM, Zhang T, Jiang B. An overview of biological production of L-theanine. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(3/4): 335-342.
- [8] Yamamoto S, Wakayama M, Tachiki T. Characterization of theanine-forming enzyme from *Methylovorus mays* No. 9 in respect to utilization of theanine production. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(2): 545-552.
- [9] Yamamoto S, Morihara Y, Wakayama M, et al. Theanine production by coupled fermentation with energy transfer using γ -glutamylmethylamide synthetase of *Methylovorus mays* No. 9. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(5): 1206-1211.
- [10] Zhao HM, van der Donk WA. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(6): 583-589.
- [11] Tachiki T, Yamada T, Mizuno K, et al. γ -glutamyl transfer reactions by glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO12694 and their application for the syntheses of theanine and γ -glutamylmethylamide. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(7): 1279-1283.
- [12] Pu HF, Wang Q, Zhu FF, et al. Cloning, expression of glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* and application to theanine synthesis. *Biocatal Biotransformat*, 2013, 31(1): 1-7.
- [13] Suzuki H, Izuka S, Miyakawa N, et al. Enzymatic production of theanine, an "umami" component of tea, from glutamine and ethylamine with bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31(6): 884-889.
- [14] Wang Q, Min C, Zhu FF, et al. Production of bioactive γ -glutamyl transpeptidase in *Escherichia coli* Using SUMO fusion partner and application of the recombinant enzyme to L-theanine synthesis. *Curr Microbiol*, 2011, 62(5): 1535-1541.
- [15] Chen XY, Su LQ, Wu D, et al. Application of recombinant *Bacillus subtilis* γ -glutamyltranspeptidase to the production of L-theanine. *Process Biochem*, 2014, 49(9): 1429-1439.
- [16] Bindal S, Gupta R. L-Theanine synthesis using γ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus licheniformis* ER-15. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(37): 9151-9159.

(本文责编 郝丽芳)