

敏捷食酸菌脞水解酶在大肠杆菌中的组成型表达及其催化高浓度烟脞水解的研究

侯现莉, 吴小梅*, 马宝娣, 徐毅*

(上海应用技术大学 化学与环境工程学院, 上海 201418)

摘要: 对来源于敏捷食酸菌的脞水解酶在大肠杆菌中的组成型表达进行了研究, 构建了组成型表达脞水解酶重组质粒 pET3b-NIT, 确定了其表达的最佳宿主菌株为 *E. coli* BL21Gold(DE3), 所得组成型菌株发酵产酶活性和比酶活分别为 $4392.39 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $953.25 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, 是原始诱导表达菌株的 2.19 和 1.94 倍. 在此基础上系统研究了该重组菌静息细胞催化高浓度烟脞水解合成烟酸的工艺条件, 发现 $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的细胞在 35°C 条件下, 2 h 可将 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的烟脞完全转化为烟酸, 时空产率达 $246.22 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. 并进行了烟酸克级规模的制备实验, 最终得到 2.23 g 烟酸, 收率为 90.65%, 纯度达 99% 以上, 实现了高底物浓度下烟酸的高效制备.

关键词: 脞水解酶; 组成型表达; 烟脞; 烟酸; 生物催化

中图分类号: O643.32; Q814.9

文献标志码: A

DOI: 10.16084/j.issn1001-3555.2024.06.007

烟酸 (3-吡啶甲酸, 维生素 B3) 是人体所必需的 13 种维生素之一, 在制药、食品和饲料工业中也有着广泛的应用, 世界烟酸及其衍生物的年需求量估计为 2.2 万吨^[1]. 目前烟酸的合成主要是通过化学方法, 通常以 3-甲基吡啶、烟脞、2-甲基-5-乙基吡啶等吡啶类化合物为原料^[2], 通过氧化或氨氧化的方式, 在液相或气相介质中添加催化剂来实现烟酸的生产^[3]. 但在化学合成过程中需要极端的环境条件 (如高温、高压等), 并伴随副产物产生, 不仅增加了成本, 而且增加了下游产物提纯的难度^[4]. 因此, 生物催化法制备烟酸作为一种相对绿色环保的合成方式也越来越受到关注^[5]. 烟酸的生物催化合成主要有两条路线, 一种是烟脞在脞水解酶作用下直接水解成烟酸, 同时释放出氨; 另一种是将烟脞在氨基水合酶作用下水解成烟酰胺, 再通过酰胺酶将烟酰胺水解成烟酸和氨^[6]. 由于脞水解酶可以实现烟酸的一步转化, 故有关烟酸的生物法制备多采用第一条路线, 即选择不同来源的脞水解酶催化水解制备烟酸.

目前有关脞水解酶催化制备烟酸的报道很多, 野生菌株 *Rhodococcus rhodochrous* J1^[4]、*Nocardia*

globerula NHB-2^[7]、*Fusarium proliferatum* ZJB-09150^[8]、*Stenotrophomonas maltophilia* AC21^[9]、*Gibberella intermedia* CGMCC 4903^[10] 和来源于 *Ralstonia eutropha* H16^[11]、*Alcaligenes faecalis* MTCC 126^[12]、*Acidovorax facilis* 72W^[6,13]、*Pseudomonas putida* CGMCC3830^[14] 等的重组菌株, 均已被用于以烟脞为底物合成烟酸. 上述不同来源的脞水解酶对脞类底物的耐受性和转化率受底物链长、脞基数、脞基与苯环距离等因素的影响. 就烟脞这一底物而言, 不同来源脞水解酶在烟脞的催化研究中, 底物浓度由 $0.025\sim 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不等, 无论野生菌株还是重组菌株的报道, 催化的底物浓度均未超过 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 烟脞为毒性底物, 对脞水解酶有抑制作用. 不同来源的脞水解酶对烟脞的耐受性会有差异, 但多通过底物补料的方式进行烟酸合成, 或者通过蛋白质工程领域内的各种手段对酶进行改造、固定化等, 进而提高其底物耐受性^[14-16]. 有报道显示, 通过酶改造, 脞水解酶已可以催化水解更高浓度的其他底物, 如 6-氯烟脞^[17].

在大肠杆菌异源表达过程中, 基因工程菌的构建是其中的一个重要环节. 迄今为止, 大肠杆菌表达

收稿日期: 2024-08-02; 修回日期: 2024-10-09.

基金项目: 上海市科委项目 (No.13430503400)(Shanghai Committee of Science and Technology (No. 13430503400)).

作者简介: 侯现莉 (1998-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物催化研究, E-mail: 216061216@mail.sit.edu.cn (Hou Xian-li (1998-), female, master degree, mainly engaged in the research of biocatalysis, E-mail: 216061216@mail.sit.edu.cn).

* 通信联系人, E-mail: wuxiaomei@sit.edu.cn; xuyi@sit.edu.cn.

系统是表达外源基因最常用的表达系统, 一个完整的表达系统由宿主菌和质粒载体两部分组成, 根据两者的选择不同可分为诱导型表达和组成型表达. 本研究涉及的表达菌株有大肠杆菌 BL21(DE3) 及 BL21Gold(DE3), 其中大肠杆菌 BL21Gold(DE3) 是在 BL21(DE3) 基础上进行改进的菌株, 具有较高的质粒转染效率, 能防止质粒 DNA 及重组蛋白的降解. 同时涉及的组成型表达质粒为 pET3b^[14], 组成型表达无需添加诱导剂, 可在恒定温度下稳定且高效地表达, 因此受到了广泛关注. Gong 等^[14] 首次构建了恶臭假单胞菌来源的胍水解酶的组成型表达体系, 采用高密度培养策略提高重组菌株的生物量和胍水解酶产量, 在 37 °C 未诱导的情况下, 总酶活最高可达 654 U·mL⁻¹. Dai 等^[18] 将胍水解酶基因克隆到 pET3a 上, 以大肠杆菌 BL21(DE3) 为宿主细胞, 酶活较诱导型表达提高了一倍. 本课题组在前期工作中, 对敏捷食酸菌来源的胍水解酶在大肠杆菌中的诱导型表达进行了系统地研究, 通过优化培养基配方、建立细胞固定化方法, 构建了填充床式生物反应器, 并将其应用于烟酸的生物合成^[6,19].

本研究首次报道了敏捷食酸菌来源的胍水解酶在大肠杆菌中的组成型表达及其对高浓度烟胍的催化水解. 以组成型表达胍水解酶的大肠杆菌全细胞为生物催化剂, 优化了烟胍制备烟酸的反应条件, 包括底物浓度、温度和细胞量(干重法, DCW), 并直接利用高浓度烟胍进行烟酸的克级制备, 简化了烟酸生物合成的过程, 降低了成本.

1 实验部分

1.1 材料

菌株与质粒: 菌株 *E. coli* BL21(DE3) pRSFDuet-1-NIT 由实验室前期构建和保藏^[6,19], 感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21Gold(DE3) 购于生工生物工程(上海)股份有限公司, 质粒 pET3b 购于武汉森灵生物科技有限公司.

主要试剂: 烟胍购于阿拉丁试剂有限公司, 烟酸购于阿达马斯试剂有限公司, 氨苄青霉素购于生工生物工程(上海)股份有限公司, 卡那霉素购于上海源叶生物科技有限公司, 质粒 DNA 小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购于天根生物科技(北京)有限公司, 其余试剂购于上海泰坦科技股份有限公司.

仪器设备: 电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; pH 计, 上海雷磁; 立式高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 干燥箱、恒温培养箱、垂直流洁净工作台, 上海一恒科技有限公司; 恒温摇床, 上海旻泉仪器有限公司; 离心机, 上海安亭科学仪器厂; PCR 仪, 美国伯乐 Bio-Rad; 电泳仪, 上海贝晶生物科技有限公司; 恒温混匀仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 紫外分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; 低温超高压细胞破碎仪, 广州聚能纳米生物科技股份有限公司; 高效液相色谱, 岛津中国有限公司.

培养基和主要溶液的配制:

LB 固体培养基 (g·L⁻¹): 胰蛋白胍 10, 酵母浸粉 5, NaCl 10, 琼脂 15, pH=7.0;

种子培养基 (g·L⁻¹): 胰蛋白胍 10, 酵母浸粉 5, NaCl 10, pH=7.0;

发酵培养基 (g·L⁻¹): 可溶性淀粉 20, 酵母浸粉 15, NaCl 5, K₂HPO₄ 4, MgSO₄·7H₂O 1, 自然 pH;

磷酸盐缓冲溶液 (100 mmol·L⁻¹ pH=7.0) 的配制: 称取 35.81 g 的 Na₂HPO₄·12H₂O, 用蒸馏水定容到 1 L; 称取 15.60 g 的 NaH₂PO₄·2H₂O, 用蒸馏水定容到 1 L. 通过 Na₂HPO₄·12H₂O : NaH₂PO₄·2H₂O = 61 : 39 的比例配制 pH=7.0 的 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液.

1.2 实验方法

1.2.1 组成型表达胍水解酶大肠杆菌的构建

从实验室已有的表达敏捷食酸菌胍水解酶的诱导型菌株 *E. coli* pRSFDuet-1-NIT 中提取重组质粒 pRSFDuet-1-NIT^[19], 再利用 PCR 技术获得所需的基因片段. 选择具有多克隆位点的 pET3b 作为组成型表达胍水解酶的质粒, 将 pRSFDuet-1-NIT MCS2 处的一段胍水解酶基因连接到 pET3b 上的 NdeI 和 BamHI 之间, 实现目的酶的表达. 因为 pET3b 和 pRSFDuet-1-NIT 中只有一个相同的酶切位点 NdeI, 所以需要在 pRSFDuet-1-NIT MCS2 处的胍水解酶基因下游设计引物添加酶切位点 BamHI, 引物设计如表 1. PCR 扩增目的基因, 随后进行酶切连接, 即得到重组胍水解酶 pET3b-NIT. 最后将连接产物导入到 *E. coli* BL21(DE3) 中, 进行培养. 随后进行测序, 测序成功后将重组质粒 pET3b-NIT 导入到 *E. coli* BL21Gold(DE3) 中, 并比较 *E. coli* BL21(DE3)-pET3b-NIT 和 *E. coli* BL21Gold(DE3)-pET3b-NIT 两重组菌株的催化活性.

表1 相关引物

Table 1 The relevant primer sequence

Primer	(5'→3')
NIT-F	TTGTACACGGCCGCATAATC
NIT-R-BamHI	CGCGGATCCAGACTCGAGCTTTGCT

1.2.2 产脲水解酶大肠杆菌的培养

菌种活化: 在无菌超净台中, 从含有重组菌的甘油管里吸取 10 μL 重组菌液加入到含有卡那抗生素的 5 mL LB 种子培养基中 (15 mL 试管), 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 12 h. 将培养好的菌液, 在含有氨苄霉素 (终浓度 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) LB 固体平板上分区划线, 置于恒温培养箱内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养 12~15 h.

种子液培养: 从事先培养好的平板上, 用接种针挑取生长较好的单菌落, 加入到含有氨苄霉素 (终浓度 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 50 mL LB 培养基中 (250 mL 摇瓶), 置于恒温摇床 (30 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 中, 培养 12 h.

发酵液培养: 以体积分数为 4% 的接种量将培养好的种子液, 接入到含有终浓度氨苄霉素 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 50 mL 发酵培养基中 (250 mL 摇瓶), 在摇床中 30 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养 12 h 后进行离心收菌.

1.2.3 菌体生物量的测定

将 1 mL 的发酵液离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min), 用质量分数 0.8% 的生理盐水洗涤 2 次, 然后再用 1 mL 的生理盐水将细胞重悬, 以相同的生理盐水做空白对照, 将细胞溶液稀释至合适的倍数, 用紫外-可见分光光度计测定 600 nm 波长处的吸光度 (比浊法, OD 值), 1 $\text{OD}_{600}=0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.2.4 细胞破碎方法

重组脲水解酶组成型表达后, 将发酵液离心、洗涤得到菌体, 然后用磷酸盐 (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.0) 重悬制得 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的细胞悬液, 混匀、破碎得到粗酶液 (破碎条件: 压力 130 MPa, 温度 4 $^{\circ}\text{C}$, 重复 2 次), 离心后对上清及沉淀进行聚丙烯酰胺凝胶电泳.

1.2.5 脲水解酶的测活方法

取 0.5 mg 干重菌体所对应的发酵液, 离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min) 收集沉淀, 再以 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液洗涤离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min) 2 次. 所得的菌体用 475 μL 磷酸盐缓冲液 (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.0) 重新悬浮, 在恒温混匀仪上预热 5 min, 加入

25 μL 含有 5% 助溶剂的底物 (反应体系中底物终浓度为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 在恒温混匀仪上反应 15 min (1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 $^{\circ}\text{C}$), 结束后立即加入 100 μL HCl 溶液 (2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 终止反应, 离心后上清液再用无水乙醇稀释, 微孔过滤膜过滤后, HPLC 分析. 酶活单位 (U) 定义为 30 $^{\circ}\text{C}$ 上述测活条件下每分钟催化生成 1 μmol 产物烟酸所需酶量定义为 1 个酶活单位 U.

1.2.6 全细胞催化烟脲水解反应的反应优化

不同底物浓度下全细胞催化烟脲的水解反应: 选择不同底物浓度 (0.2、0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 (1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行反应, 用于确定最大的底物耐受浓度. 0.5 mL 反应体系, 细胞量 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 恒温混匀仪, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 反应不同时间 (0.5、1、2、3、4、6、8 h), 取样 HPLC 测定转化率.

不同温度下全细胞催化烟脲的水解反应: 0.5 mL 反应体系, 选择不同的反应温度 (25、30、35、40、50 $^{\circ}\text{C}$), 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH=7.0 的 PBS, 在不同温度下预热 5 min, 加入终浓度为 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的底物, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下分别反应 1、2、3、4、5、6 h, 采用 HPLC 分析转化率.

不同细胞量下全细胞催化烟脲的水解反应: 0.5 mL 反应体系, 选择不同的细胞量 (2、4、8、12、16、20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH=7.0 的 PBS, 预热 5 min, 加入终浓度为 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的底物, 在上述温度下, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 分别反应 0.5、1、2、3、4、5 h, 通过 HPLC 分析转化率.

1.2.7 烟酸的制备及鉴定

在 10 mL 磷酸盐缓冲液 (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中^[19], 依次添加 12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞和 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的烟脲, 在 35 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下反应 2 h. 中间取样, 用 HPLC 分析至无底物残留时停止反应. 收集反应液, 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 30 min, 然后在 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离心 30 min, 收集上清液并用 5 mL 蒸馏水洗涤沉淀 5 遍. 将上清和洗涤液合并, 向其滴加浓盐酸至 pH=3.7 静置析晶, 待晶体全部析出后, 立即对其加热溶解, 用布氏漏斗趁热过滤以除去不溶杂质, 然后将滤液放在室温自然冷却 30 min, 再放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜进行重结晶, 抽滤得到的晶体后干燥. 抽滤后的液体进行旋转蒸发浓缩, 进一步提高烟酸产率. 将制备出的烟酸产品进行定性定量分析, 主要通过核磁共振 (NMR)、HPLC 鉴定结构并分析纯度.

1.2.8 分析方法

HPLC 检测: 液相色谱柱为 C18 反相柱, 流动相

A 液为乙腈, B 液为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=2.5 的磷酸二氢钠, 柱温 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 $10 \mu\text{L}$, 在 217 nm 处检测, 以 15% A + 85% B 为流动相洗脱. 烟酸和烟脲的保留时间分别为 3.4 和 6.4 min.

2 结果与讨论

2.1 不同载体、宿主细胞对酶表达的影响

在实验室已有重组质粒 pRSFDuet-1-NIT 的基础上, 通过设计引物, 酶切连接, 将脲水解酶目的基因连接到了 pET3b 上的 NdeI 和 BamHI 之间, 成功构建了组成型表达的重组质粒 pET3b-NIT. 如图 1 所示, *E. coli* BL21(DE3)pET3b-NIT 蛋白表达中可溶性表达占比较高, 更换宿主细胞为 *E. coli* BL21Gold(DE3) 后, 蛋白表达量明显增大, 可溶性表达水平和包涵体的含量相较于 *E. coli* BL21(DE3) 菌株均有所增加. 通过表 2 也可定量的看出质粒载体 pET3b-NIT 和宿主细胞 *E. coli* BL21Gold(DE3) 对脲水解酶表达的影响. 当宿主菌株同为 *E. coli* BL21(DE3) 时, 其中质粒为 pET3b-NIT 的菌株的比酶活是诱导型质粒 pRSFDuet-1-NIT 的 1.37 倍; 当质粒同为 pET3b-NIT 时, 宿主细胞 *E. coli* BL21Gold(DE3) 对 pET3b-NIT 表达的影

响更加显著, 比酶活是在 *E. coli* BL21(DE3) 宿主中表达的 1.42 倍. 最终构建的菌株 *E. coli* BL21Gold(DE3)pET3b-NIT 酶活和比酶活分别为 $4\,392.39 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $953.25 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, 是初始菌株 *E. coli* BL21(DE3)pRSFDuet-1-NIT 的 2.19 和 1.94 倍. 通过比较, 选择比酶活最高的菌株 *E. coli* BL21Gold(DE3)pET3b-NIT 进行后续的生物催化研究.

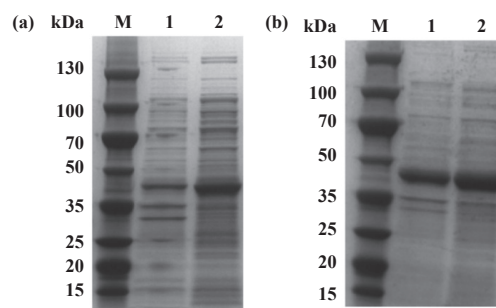


图 1 重组脲水解酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳:(a) *E. coli* BL21(DE3)pET3b-NIT; (b) *E. coli* BL21Gold(DE3)pET3b-NIT; M: 标准蛋白; 1: 沉淀; 2: 上清)

Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant nitrilase: (a) *E. coli* BL21(DE3)pET3b-NIT; (b) *E. coli* BL21Gold(DE3)pET3b-NIT; M, standard protein; 1, precipitate; 2, supernatant)

表 2 不同重组脲水解酶大肠杆菌工程菌的酶活比较

Table 2 Comparison of enzyme activity of different recombinant *E. coli* producing nitrilase

Nitrilase engineered bacteria	Enzyme activity/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	Specific activity/($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pRSFDuet-1-NIT ^[19]	$2\,003.16\pm 1.73$	491.66 ± 0.11
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pET3b-NIT	$2\,881.31\pm 2.02$	672.17 ± 2.22
<i>E. coli</i> BL21Gold(DE3)pET3b-NIT	$4\,392.39\pm 0.34$	953.25 ± 2.41

2.2 底物浓度对烟脲转化率的影响

底物浓度对酶活性的影响主要体现在酶促反应速率上, 在底物浓度较低时, 反应速率和底物浓度近似成正比关系. 随着底物浓度的继续提高, 反应速率变化幅度逐渐减小. 当底物浓度达到一定限度时, 酶与底物结合接近饱和状态, 反应速率不再改变. 同时底物对酶活性的影响也会影响反应速率. 由此可见, 底物浓度是影响酶促反应的重要因素. 如图 2(a) 所示, 低底物浓度 ($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 经 2 h 转化完全, 浓度为 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 经 3 h 转化完全. 如图 2(b) 所示, 高底物浓度 1.0 和 $1.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 均 3 h 转化完全, 相较于实验室已有的基因工程菌^[19], 反应速率分别提高了 1.00 和 1.67 倍. 考虑到细胞量和底物浓度等因素,

最终选择的条件为 $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞, $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物, 6 h 反应完全, 并以此为基础进行后续实验.

2.3 温度对烟脲转化率的影响

在催化反应中, 温度是影响酶促反应的关键因素^[20-23]. 由于酶的种类不同导致酶的最适温度也有所差异, 有少部分酶属于嗜热酶, 高温有利于催化反应; 而大部分酶在高温下容易失活且温度稳定性较差. 所以我们对脲水解酶催化反应的最适温度以及温度稳定性的研究必不可少. 如图 2(c) 所示, 从 25 到 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 转化速率逐渐加快, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时的转化速率与 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 非常相近, 可以看出 35 或 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 是该反应条件下的最适温度. 为减少耗能, 因此选择 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 为后续反应温度.

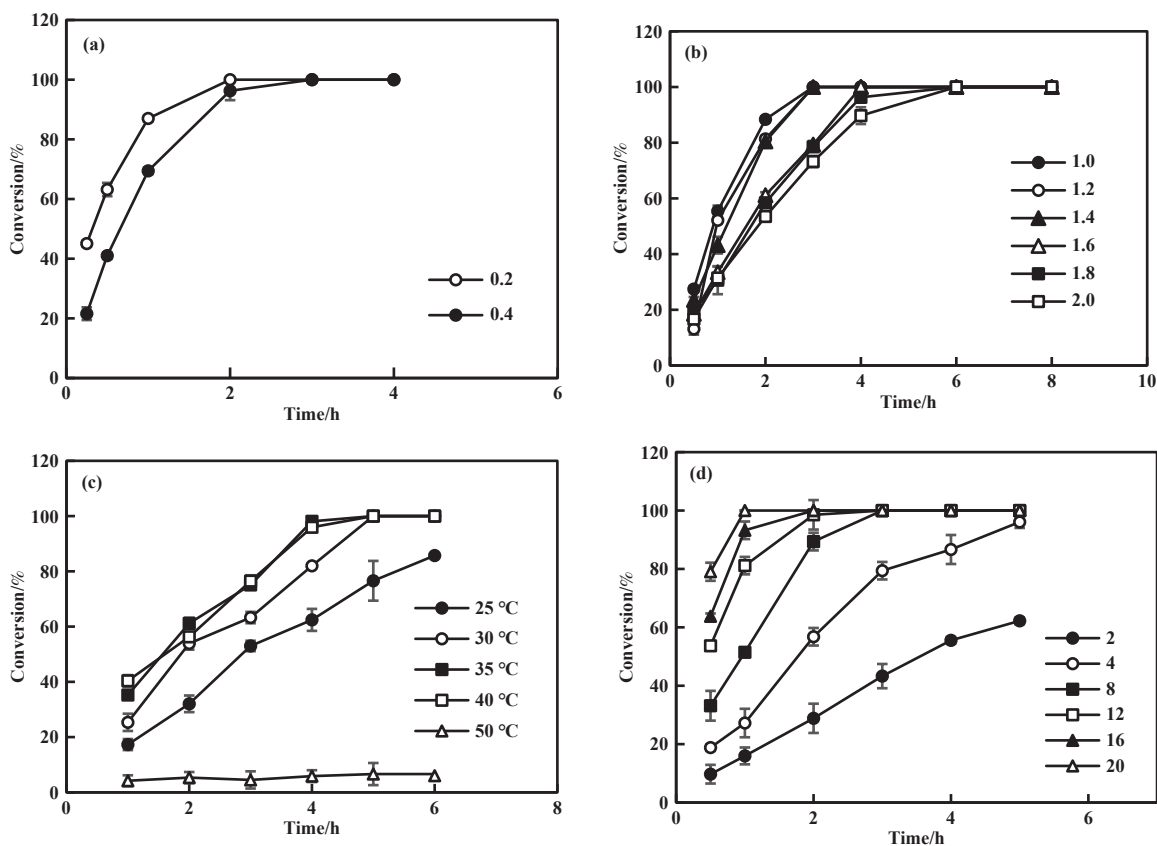


图 2 底物浓度 (a) $0.2\sim 0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) $1.0\sim 2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 反应温度 (c) 和细胞添加量 (d) 对烟腈转化率的影响
Fig.2 Effects of substrate concentration (a) $0.2\sim 0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) $1.0\sim 2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, reaction temperature (c) and cell amount (d) on the conversion of nicotinonitrile

2.4 细胞量对烟腈转化率的影响

通常情况下, 生物催化反应中催化剂的量越多, 其反应速度也会随之加快, 但当细胞量增加到一定程度后, 反应速度便不会继续增加. 所以为达到 100% 的底物转化率 (摩尔分数) 同时节约成本, 需对催化剂的浓度进行优化. 如图 2(d) 所示, 随着细胞量 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, DCW) 的增加, 转化率也逐渐提高. 细胞量为 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 转化率最低, 细胞量为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 转化率最高. 结合时空转化率的计算可知, 加入细胞为 $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其时空产率为 $246.22\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 相较于 $16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($184.67\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 时空产率更大, 同时考虑到成本问题, 因此选择 $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 烟酸的制备实验.

2.5 烟酸的克级规模生物合成

利用 $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 重组腈水解酶细胞 *E. coli* BL21Gold(DE3)pET3b-NIT, 将 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 烟腈经 2 h 水解完全转化为烟酸, 最终得到 2.23 g 白色晶体, 提取烟酸的收率为 90.65%, 时空产率 $246.2\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. 提取出来的烟酸经过 HPLC 分析其纯度可达 99%

以上. 且由核磁共振图谱中的氢谱可以证明其结构的准确性, 见图 3, $^1\text{H NMR}$ (401 MHz , DMSO-d_6) δ 13.40 (s, 1H), 9.07 (d, $J = 2.1\text{ Hz}$, 1H), 8.91-8.65 (m, 1H), 8.26 (dt, $J = 7.9, 1.9\text{ Hz}$, 1H), 7.53 (dd, $J = 7.8, 5.0\text{ Hz}$, 1H). 顾炳琛等^[24] 通过 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 烟腈分批次进行反应, 最终在 290 min 内通过 22 批底

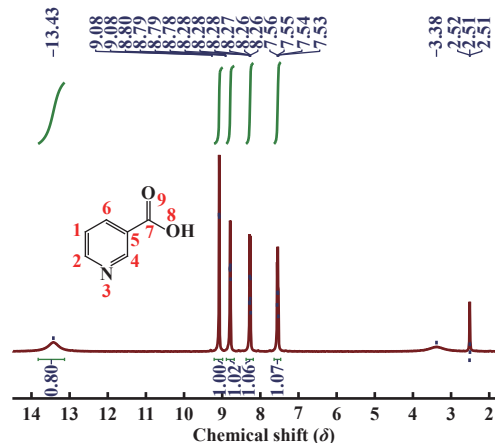


图 3 烟酸的核磁共振氢谱

Fig.3 $^1\text{H NMR}$ spectrum of nicotinic acid

物投料成功产生 $541 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 烟酸. Pai 等^[12] 也进行了 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 烟腈进行分批次实验, 6 h 制得 $123 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的烟酸. 相较之下, 该腈水解酶可将 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的底物完全转化, 一次投料即可制得 $223 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的烟酸, 无需分批次补加底物, 简化了制备的过程.

3 结论

本研究进行了组成型腈水解酶重组菌 *E. coli* BL21(DE3)pET3b-NIT 的制备, 并与其他腈水解酶基因工程菌作了比较, 其中运用到的质粒载体 pET3b 更有利于腈水解酶的可溶性表达, 宿主细胞 *E. coli* BL21Gold(DE3) 更有利于提高腈水解酶的蛋白表达水平. 相较于 *E. coli* BL21(DE3)pET3b-NIT, *E. coli* BL21Gold(DE3)pET3b-NIT 比酶活提高 1.42 倍, 也是原始诱导表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pRSFDuet-1-NIT 的 1.94 倍. 同时优化了该重组菌株催化烟腈制备烟酸的反应条件, 得到了最佳反应条件为: 反应温度 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的细胞, 底物为 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的烟腈, 2 h 反应完全. 并在此基础上进行了烟酸的制备实验, 得到 2.23 g 烟酸, 收率为 90.65%, 纯度可达 99% 以上, 时空产率为 $246.2 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. 实现了高底物浓度下烟酸的生物合成, 简化了利用腈水解酶生物合成烟酸的过程, 降低了生产成本, 使生物法合成烟酸的过程更简易、更绿色.

参考文献:

- [1] Kopp C, Hosseini A, Singh S P, et al. Nicotinic acid increases adiponectin secretion from differentiated bovine preadipocytes through G-protein coupled receptor signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, **15**(11): 21401–21418.
- [2] Li H, Dong W L, Zhang Y, et al. Enhanced catalytic efficiency of nitrilase from *Acidovorax facilis* 72W and application in bioconversion of 3-cyanopyridine to nicotinic acid[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2016, **133**(S1): S459–S467.
- [3] Lisicki D, Nowak K, Orlińska B. Methods to produce nicotinic acid with potential industrial applications[J]. *Materials*, 2022, **15**(3): 765.
- [4] Mathew C D, Nagasawa T, Kobayashi M, et al. Nitrilase-catalyzed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochromus* J1[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(4): 1030–1032.
- [5] Velankar H, Clark K G, du Preez R, et al. Developments in nitrile and amide biotransformation processes[J]. *Trends Biotechnol*, 2010, **28**(11): 561–569.
- [6] Liu X J, Ma B D, Wu X M, et al. Highly efficient biosynthesis of nicotinic acid by immobilized whole cells of *E. coli* expressing nitrilase in semi-continuous packed-bed bioreactor[J]. *Catalysts*, 2023, **13**(2): 371.
- [7] Sharma N N, Sharma M, Kumar H, et al. *Nocardia globnerula* NHB-2: Bench scale production of nicotinic acid[J]. *Process Biochem*, 2006, **41**(9): 2078–2081.
- [8] Jin L Q, Liu Z Q, Xu J M, et al. Biosynthesis of nicotinic acid from 3-cyanopyridine by a newly isolated *Fusarium proliferatum* ZJB-09150[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, **29**(3): 431–440.
- [9] Badoei-Dalfard A, Karami Z, Ramezani-pour N. Bench scale production of nicotinic acid using a newly isolated *Stenotrophomonas maltophilia* AC21 producing highly-inducible and versatile nitrilase[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2016, **133**(S1): S552–S559.
- [10] Wu Y, Gong J S, Lu Z M, et al. Isolation and characterization of *Gibberella intermedia* CA3-1, a novel and versatile nitrilase-producing fungus[J]. *J Basic Microbiol*, 2013, **53**(11): 934–941.
- [11] Fan H Y, Chen L F, Sun H H, et al. A novel nitrilase from *Ralstonia eutropha* H16 and its application to nicotinic acid production[J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2017, **40**(8): 1271–1281.
- [12] Pai O, Banoth L, Ghosh S, et al. Biotransformation of 3-cyanopyridine to nicotinic acid by free and immobilized cells of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Process Biochem*, 2014, **49**(4): 655–659.
- [13] Gavagan J E, Dicosimo R, Eisenberg A, et al. A Gram-negative bacterium producing a heat-stable nitrilase highly active on aliphatic dinitriles[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**(5): 654–659.
- [14] Gong J S, Zhang Q, Gu B C, et al. Efficient biocatalytic synthesis of nicotinic acid by recombinant nitrilase via high density culture[J]. *Bioresour Technol*, 2018, **260**: 427–431.
- [15] Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, et al. Nicotinic acid bio-production by *Microbacterium imperiale* CBS 489-74: Effect of 3-cyanopyridine and temperature on amidase activity[J]. *Process Biochem*, 2012, **47**(7): 1192–1196.
- [16] Monika, Sheetal, Thakur, N, et al. Biotransformation of 3-cyanopyridine to nicotinic acid using whole-cell nitrilase of *Gordonia terrae* mutant MN12[J]. *Bioproc and*

- Biosyst Eng*, 2023, **46**(2): 195–206.
- [17] Zheng Ren-chao(郑仁朝), Tang Xiao-ling(汤晓玲), Jin Jin(金金), *et al.* Application and mutant of a nitrilase in selectively catalyzing the synthesis of 6-chloronicotinic acid from 6-chloronicotinitrile(一种腈水解酶在选择性催化 6-氯烟腈合成 6-氯烟酸中的应用及突变体): CN(中国专利), 202211100878.3[P]. 2023-06-13.
- [18] Dai A D, Wu Z M, Zheng R C, *et al.* Constitutive expression of nitrilase from *Rhodococcus zopfii* for efficient biosynthesis of 2-chloronicotinic acid[J]. *3 Biotech*, 2022, **12**(2): 50.
- [19] Liu Xue-jiao(刘雪姣). Study on catalytic synthesis of vitamin B3 by recombinant nitrilase(重组腈水解酶催化合成维生素 B3 的研究)[D]. Shanghai(上海): Shanghai Institute of Technology(上海应用技术大学), 2019.
- [20] Cheng Wei(程伟), Xin Jia-ying(辛嘉英), Chen Li-xin(陈立新), *et al.* Research progress of mechanoenzyme-catalyzed reaction (机械酶催化反应研究进展)[J]. *J Mol Catal (China)(分子催化)*, 2024, **38**(4): 375–385.
- [21] Li Huan-huan(李欢欢), Duan Pei-gao(段培高), Huang Ya-wen(黄雅文), *et al.* One pot photoenzymatic cascades to synthesize chiral aliphatic amines(光酶级联一锅法合成手性脂肪胺)[J]. *J Mol Catal (China)(分子催化)*, 2023, **37**(4): 323–330.
- [22] Yin Yi(尹一), Sun Li-rui(孙立瑞), Fang Qi-li(方祁利), *et al.* Optimization of microwave enhanced gold nanoparticles-CRL hybridase (AuNPs-CRL) catalyzed synthesis of phytosterol esters(微波强化纳米金杂化 CRL 脂肪酶催化甾醇油酸酯的合成)[J]. *J Mol Catal (China)(分子催化)*, 2022, **36**(6): 522–533.
- [23] Chen Lin-lin(陈林林), Zhang Jia-xin(张佳欣), Li Wei(李伟), *et al.* Preparation and catalytic properties of inorganic hybrid lipase(无机杂化脂肪酶的制备及其催化性能研究)[J]. *J Mol Catal (China)(分子催化)*, 2022, **36**(3): 235–244.
- [24] Gu Bing-chen(顾炳琛), Gong Jin-song(龚劲松), Long Hua(龙华), *et al.* The fermentation process of a nitrilase-producing strain and its catalytic properties(产腈水解酶重组菌的发酵工艺及催化性质研究)[J]. *J Mol Catal (China)(分子催化)*, 2019, **33**(2): 174–180.

Constitutive Expression of *Acidovorax facilis* Nitrilase in *E. coli* and Its Application in the Hydrolysis of Nicotinonitrile in High Concentration

HOU Xian-li, WU Xiao-mei*, MA Bao-di, XU Yi*

(School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract: The constitutive expression of nitrilase derived from *Acidovorax facilis* in *E. coli* was studied, and the constitutively expressed nitrilase recombinant plasmid pET3b-NIT was constructed, and the optimal host strain for its expression was determined to be *E. coli* BL21Gold(DE3). The enzyme activity and specific activity of recombinant *E. coli* were $4\,392.39\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ and $953.25\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, which were 2.19 and 1.94 times higher than those of the original inducible expression strain, respectively. On this basis, the process conditions for the hydrolysis of high concentration of nicotinonitrile for the synthesis of nicotinic acid by resting cells were systematically investigated. It was found that $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nicotinonitrile could be completely converted to nicotinic acid by $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ cells for 2 h at $35\text{ }^\circ\text{C}$, and the space-time yield was up to $246.22\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Preparation experiments on the gram scale of nicotinic acid were also performed, and 2.23 g of nicotinic acid was obtained in 90.65% yield and over 99% HPLC purity, achieving efficient preparation of nicotinic acid at high substrate concentration.

Key words: nitrilase; constitutive expression; nicotinonitrile; nicotinic acid; biocatalysis