

# 重组枯草芽孢杆菌全细胞催化高效合成 2'-脱氧腺苷

陈伟<sup>1</sup>, 陈令伟<sup>1</sup>, 李文超<sup>2</sup>, 郑玲辉<sup>1\*</sup>

(1. 杭州琿益生物科技有限公司, 浙江 杭州 310011; 2. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 以枯草芽孢杆菌 168 (简称为 BS) 为宿主, 以脱氧胸苷和腺嘌呤为底物, 异源表达组合来源于大肠杆菌 (*E. coli*) 的嘧啶核苷磷酸化酶 (PyNP) 与嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 作为催化酶源, 全细胞催化合成 2'-脱氧腺苷 (dA)。首先, 以 BS 敲除内源性的 PNP (由基因 *deoD* 编码, Gene ID: 940038) 后的菌株 BS0 为出发菌株, 经过 PyNP1 酶 (来源于 *E. coli*, Gene ID: 948901) 与 PNP3 酶 (来源于 *E. coli*, Gene ID: 945654) 的重组表达得到 CW3, 再优化 PyNP1 与 PNP3 的对核糖体结合位点 (RBS) 序列得到重组菌株 CW3-3, 在 CW3-3 作用下, dA 的产量为 133.4 g/L, 脱氧胸苷的转化率为 64.3%; 其次, 以 CW3-3 为出发菌株, 利用互作短肽构建自组装多酶复合物, 经过 PyNP1 酶 N 端融合 RIAD, PNP3 酶 C 端融合 RIDD (其中 RIAD 和 RIDD 为互作短肽标签) 处理后, PyNP1 酶 N 端融合 4 个 RIAD 标签得到重组菌株 CW17, 在其作用下, dA 的产量达到 179.6 g/L, 显著提升了底物转化率; 最后, 对重组菌株 CW17 全细胞催化条件细胞添加质量浓度及催化反应温度进行了优化, 在细胞添加质量浓度为 150 g/L, 反应温度 50 °C 条件下, dA 的产量达到 200.3 g/L, 脱氧胸苷的转化率为 96.6%。

**关键词:** 2'-脱氧腺苷; 嘧啶核苷磷酸化酶; 嘌呤核苷磷酸化酶; 互作短肽; 枯草芽孢杆菌; 全细胞催化; 生物工程

中图分类号: TQ460.1; TQ426.97 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 11-2436-09

## Highly efficient production of 2'-deoxyadenosine by whole-cell catalysis of engineered *Bacillus subtilis*

CHEN Wei<sup>1</sup>, CHEN Lingwei<sup>1</sup>, LI Wenchao<sup>2</sup>, ZHENG Linghui<sup>1\*</sup>

(1. Hangzhou Hizyme Biotech Co., Ltd., Hangzhou 310011, Zhejiang, China; 2. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, Tianjin, China)

**Abstract:** 2'-Deoxyadenosine (dA) was synthesized from the whole cell of *Bacillus subtilis* 168 (BS for short), which were catalyzed by the heterologous enzymes of pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNP) and purine nucleoside phosphorylase (PNP) from *Escherichia coli*, using deoxythymidine and adenine as substrate. The recombinant *B. subtilis* CW3-3, which was obtained from recombinant expression of PyNP1 enzyme (from *E. coli*, Gene ID: 948901) and PNP3 enzyme (from *E. coli*, Gene ID: 945654) and optimization of the ribosome binding site (RBS) for PyNP1 and PNP3 enzyme using BS0 strain (BS strain knocked out of endogenous PNP and encoded by Gene *deoD*, Gene ID: 940038) as starting strain, exhibited a yield of dA 133.4 g/L and a conversion rate of deoxythymidine 64.3%. Moreover, *B. subtilis* CW3-3 was further used as starting strain to construct a self-assembled multi-enzyme complex with interacting short peptides. After treatment with N-terminal fusion RIAD of PyNP1 enzyme and C-terminal fusion RIDD of PNP3 enzyme (RIAD and RIDD are interacting short peptide labels), the N-terminal fusion of PyNP1 enzyme fused with four RIAD labels to obtain recombinant strain *B. subtilis* CW17, which improved the yield of dA to 179.6 g/L. Finally, the cell addition mass concentration and catalytic reaction temperature conditions of the recombinant *B. subtilis* CW17 whole-cell catalysis were optimized and further boosted the

收稿日期: 2023-02-23; 定用日期: 2023-05-19; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230127

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (2019KJ237)

作者简介: 陈伟 (1989—), 男, 博士, E-mail: doctor.chen1989@foxmail.com。联系人: 郑玲辉 (1978—), 男, 硕士, E-mail: zhenglinghui@huidabiotech.com。

production of dA to 200.3 g/L and the conversion rate of deoxythymidine to 96.6%.

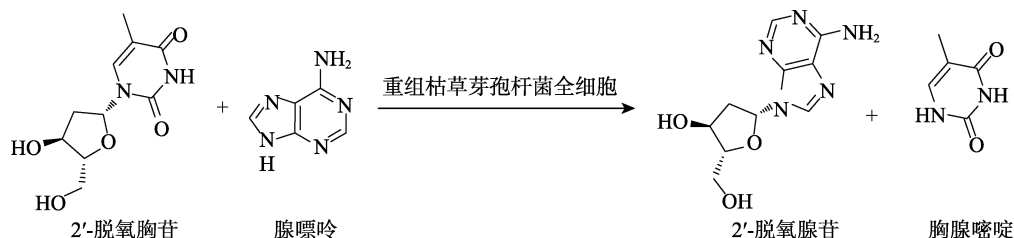
**Key words:** 2'-deoxyadenosine; pyrimidine nucleoside phosphorylase; purine nucleoside phosphorylase; interacting short peptide; *Bacillus subtilis*; whole-cell catalysis; bioengineering

2'-脱氧腺苷 (dA) 是脱氧核糖核酸 (DNA) 的结构组成物质<sup>[1-3]</sup>, 其被广泛应用于人工合成寡聚核苷酸等领域, 是基因工程药物研究领域的重要原材料<sup>[4-7]</sup>。此外, 对 dA 的碱基或脱氧核糖进行修饰获得的核苷类衍生物不仅可以直接促进生物体内蛋白质与核酸的代谢合成<sup>[8-11]</sup>, 而且可以作为化学中间体用于抗病毒、抗肿瘤及抗艾滋病等药物的合成<sup>[4,7,10-13]</sup>。

当前, dA 的制备主要有脱氧核糖核酸降解法<sup>[14]</sup>、化学合成法<sup>[15-19]</sup>和生物酶催化法<sup>[20-27]</sup>。脱氧核糖核酸降解法中底物脱氧核糖核酸稳定性较差, 容易在制备过程中产生大量副产物, 收率较低<sup>[14]</sup>。化学合成法则因制备成本高、环境不友好等无法满足当前市场需求<sup>[15,17-19]</sup>。相比于以上两种制备方法, 生物酶催化法则可利用具有高核苷磷酸化酶活性的细胞作为催化酶源, 以脱氧胸苷及腺嘌呤作为反应底物实现 dA 的合成<sup>[22-25]</sup>。LIANG 等<sup>[26]</sup>在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 内过表达内源性的核苷磷酸化酶, 可实现 dA 的高效催化合成, 腺嘌呤的转化率可达 96%。刘国生等<sup>[25]</sup>利用聚丙烯酰胺固定化酶

源细胞, 重复催化 10 次后脱氧胸苷的转化率仍达 32%。生物酶催化法不仅可以满足 dA 市场的增长需求, 而且绿色环保, 是解决资源可持续化问题的最佳途径之一<sup>[22-28]</sup>。但生物酶法依然存在底物浓度低, dA 生产成本偏高, 进而导致其大规模应用受限等问题<sup>[21-26]</sup>。王建琨<sup>[20]</sup>利用大肠杆菌游离细胞进行生物转化合成 dA, 当反应底物脱氧胸苷质量浓度为 13 g/L 时, 脱氧胸苷转化率为 56.2%, 底物质量浓度及底物转化率均较低。此外, LIANG 等<sup>[26]</sup>在 *E. coli* 内过表达内源性的核苷磷酸化酶实现了 dA 的催化合成, 虽然腺嘌呤的转化率可达 96%, 但最终得到的 dA 质量浓度仅为 14.4 g/L, 无法满足工业化生产需求。

针对生物酶法存在的问题, 本文以枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* 168) 为宿主, 异源表达并组合优化不同来源的嘧啶核苷磷酸化酶 (PyNP) 与嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 以实现 dA 的全细胞催化合成 (反应路线如下所示), 为 dA 的生产提供一种绿色高效的催化合成工艺。



## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂与仪器

所用菌株如表 1 所示。

Prime STAR DNA 聚合酶, 生物试剂, 宝生物工程 (大连) 有限公司; Taq DNA 聚合酶, 生物试剂, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 氯霉素 (美国药典级, 色谱含量为 97%~103%)、氨苄青霉素 (钠盐, 美国药典级, 含量为 845~988 mg/g)、卡那霉素 (硫酸盐, 美国药典级, 含量  $\geq 750$  mg/g)、质粒提取试剂盒 (生物试剂), 生工生物工程 (大连) 股份有限公司; 博莱霉素 (生物试剂, 质量浓度为 100 g/L)、DNA 片段回收试剂盒 (生物试剂), 美国赛默飞世尔科技有限公司; 无缝克隆试剂盒, 生物试剂, 上海碧云天生物科技有限公司; 脱氧胸苷 (2'-脱氧胸苷, 医药级, HPLC 含量  $\geq 99\%$ ), 芜湖华仁科技有限公司; 腺嘌呤 (医药级, HPLC 含量  $\geq 99\%$ ), 北京百灵威科技有限公司; 葡萄糖 (无

水), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 酵母粉 (YP600)、酵母抽提粉 (FM808)、酵母膏 (LM800), 安琪酵母股份有限公司; 蛋白胨 (Y001A), 北京鸿润宝顺科技有限公司; 琼脂粉 (A8190), 北京索莱宝科技有限公司; 除特别说明, 其他常规试剂均为国药分析纯。

LB 培养基 (均为质量浓度, 下同): 蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L, 固体培养基额外添加质量分数为 2% 的琼脂粉。

种子培养基: 葡萄糖 30 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母膏 10 g/L、酵母抽提粉 5 g/L、氯化钙 2 g/L、硫酸镁 2 g/L、磷酸二氢钾 5 g/L, 灭菌前用质量分数为 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0。

发酵培养基: 葡萄糖 30 g/L、酵母膏 10 g/L、酵母抽提粉 10 g/L、吐温-80 6 g/L、柠檬酸铵 4 g/L、硫酸镁 3 g/L、磷酸二氢钾 6 g/L、氯化钾 3 g/L、氯化钙 3 g/L, 灭菌前用质量分数为 30% 的氢氧化钠水溶液调节 pH 至 6.0。

表 1 实验中所用菌株的特征与来源  
Table 1 Characteristics and origin of strains used in the experiment

菌株 <sup>①</sup>	特征 <sup>②</sup>	来源
<i>E. coli</i> JM109	质粒宿主	实验室保藏
BS	<i>B. subtilis</i> 168	实验室保藏
BS0	<i>B. subtilis</i> 168 $\Delta deoD$	本实验构建
CW1	BS0, pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP1, p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP1	本实验构建
CW2	BS0, pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP1, p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP2	本实验构建
CW3	BS0, pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP1, p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP3	本实验构建
CW4	BS0, pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP1, p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP4	本实验构建
CW5	BS0, pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP2, p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP1	本实验构建
CW6	BS0, pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP2, p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP2	本实验构建
CW7	BS0, pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP2, p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP3	本实验构建
CW8	BS0, pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP2, p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP4	本实验构建
CW3-1	CW3, 优化 PyNP1 的 RBS 序列	本实验构建
CW3-2	CW3, 优化 PNP3 的 RBS 序列	本实验构建
CW3-3	CW3, 优化 PyNP1 与 PNP3 的 RBS 序列	本实验构建
CW9	CW3-3, PyNP1 酶 N 端融合 PDZ, PNP3 酶 C 端融合 PDZ lig	本实验构建
CW9-1	CW3-3, PyNP1 酶 N 端融合 PDZ	本实验构建
CW9-2	CW3-3, PNP3 酶 C 端融合 PDZ lig	本实验构建
CW10	CW3-3, PyNP1 酶 N 端融合 RIAD, PNP3 酶 C 端融合 RIDD	本实验构建
CW10-1	CW3-3, PyNP1 酶 N 端融合 RIAD	本实验构建
CW10-2	CW3-3, PNP3 酶 C 端融合 RIDD	本实验构建
CW11	CW3-3, PyNP1 酶 N 端融合 CCDIA, PNP3 酶 C 端融合 CCDIB	本实验构建
CW11-1	CW3-3, PyNP1 酶 N 端融合 CCDIA	本实验构建
CW11-2	CW3-3, PNP3 酶 C 端融合 CCDIB	本实验构建
CW12	CW10, PNP3 酶 C 端融合 2 个 RIDD 标签	本实验构建
CW13	CW10, PNP3 酶 C 端融合 3 个 RIDD 标签	本实验构建
CW14	CW10, PNP3 酶 C 端融合 4 个 RIDD 标签	本实验构建
CW15	CW10, PyNP1 酶 N 端融合 2 个 RIAD 标签	本实验构建
CW16	CW10, PyNP1 酶 N 端融合 3 个 RIAD 标签	本实验构建
CW17	CW10, PyNP1 酶 N 端融合 4 个 RIAD 标签	本实验构建
CW18	CW10, PyNP1 酶 N 端融合 5 个 RIAD 标签	本实验构建

①BS0 为 *B. subtilis* 168 敲除内源性的 PNP (由基因 *deoD* 编码, Gene ID: 940038) 后的菌株; 以 BS0 为出发菌株, 经过表中特征栏中所述操作获得的重组 *B. subtilis* 菌株分别对应命名为 CW1~CW18。②pHT 与 p43NMK 均为质粒名称, 质粒构建信息列于表 2; 以 pHT-P<sub>veg</sub>-PyNP1 质粒为例, 该质粒是以 pHT 质粒作为载体, 利用启动子 P<sub>veg</sub> 介导酶 PyNP1 的表达; PyNP1、PyNP2 及 PNP1~PNP4 的来源和基因序列号在 2.1 节详细说明。PDZ 与 PDZ lig、RIAD 与 RIDD、CCDIA 与 CCDIB 均为互作短肽标签。RBS 为对核糖体结合位点。

培养基中添加相应的抗生素: 氨苄青霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氯霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、卡那霉素 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、博莱霉素 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

T100 聚合酶链反应仪 (PCR), 美国伯乐公司; YM 型立式压力蒸汽灭菌器, 上海三申医疗器械有限公司; SW-CJ-1FD 型超净工作台, 苏州苏净集团安泰空气技术有限公司; ZQZY-108 型实验室恒温培养摇床, 上海知楚仪器有限公司; 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; Scientz-II D 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Sorvall Lynx 4000 型落地式冷冻离心机, 美国赛默飞世尔科技有限公司;

TGL-10C 飞鸽台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; S210 型 pH 计, 瑞士梅特勒-托利多公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌株构建

质粒表达载体的构建: 本文所构建的表达载体如表 2 所示。以构建质粒 pHT-P<sub>veg</sub>-PyNP1 为例, 首先利用引物 pHT-F1、pHT-R1 以质粒 pHT 为模板进行扩增得到线性化质粒片段 pHT-1; 其次, 利用引物 PyNP1-F1、PyNP1-R1 从 *E. coli* BL21 基因组中扩增出目的基因 *PyNP1* 片段; 之后, 利用无缝克隆试剂盒将目的基因片段 *PyNP1* 与线性化质粒片段 pHT-1 连接转入 *E. coli* JM109 中, 测序选择正确的单菌落进行培养提取重组质粒 pHT-P<sub>veg</sub>-PyNP1, 备用。

表 2 实验中所用质粒的特征与来源  
Table 2 Characteristics and origin of plasmids used in the experiment

质粒	特征	来源
pHT	ColE1, Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , RepA, <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> 穿梭质粒, $\Delta P_{veg}::egfp$	实验室保藏
p43NMK	ColE1, Amp <sup>r</sup> , RepB, Kan <sup>r</sup> , <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> 穿梭质粒, $\Delta P_{43}::egfp$	实验室保藏
pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP 系列	pHT 衍生质粒, P <sub>veg</sub> 表达不同来源的 PyNP 基因	本实验构建
p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP 系列	p43NMK 衍生质粒, P <sub>43</sub> 表达不同来源的 PNP 基因	本实验构建
pHT-P <sub>veg</sub> -PDZ/RIAD/CCDIA-PyNP 系列	pHT-P <sub>veg</sub> -PyNP 系列衍生质粒, PyNP 酶 N 端融合 PDZ/RIAD/CCDIA 短肽标签	本实验构建
p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP-PDZ lig/RIDD/CCDIB 系列	p43NMK-P <sub>43</sub> -PNP 系列衍生质粒, PNP 酶 C 端融合 PDZ lig/RIDD/CCDIB 短肽标签	本实验构建

注: 以 p43NMK 质粒为例, ColE1 为 *E. coli* 复制子, Amp<sup>r</sup> 表示该质粒在 *E. coli* 中表现为氨苄抗性, RepA 和 RepB 为 *B. subtilis* 复制子, Kan<sup>r</sup> 表示该质粒在 *B. subtilis* 中表现为卡那抗性,  $\Delta P_{43}::egfp$  表示敲除该质粒上的 P<sub>43</sub> 启动子区域, 插入增强型绿色荧光蛋白 *egfp* 基因片段。

表达敲除框的构建: 利用 *Cre/loxP* 重组酶系统进行基因组编辑<sup>[29]</sup>。以敲除 PNP 酶的编码基因 *deoD* 为例, 首先利用引物 deoD-U-F、deoD-U-R 从 *B. subtilis* 168 基因组中扩增出上游同源臂 deoD-U, 利用引物 deoD-D-F、deoD-D-R 从 *B. subtilis* 168 基因组中扩增出下游同源臂 deoD-D; 其次, 在上下游同源臂之间融合添加相应的抗性标签基因与 *loxP* 位点, 最终获得 *deoD* 基因的表达敲除框。

多酶复合物的构建: 选择 3 种互作短肽 (PDZ 与 PDZ lig、RIAD 与 RIDD、CCDIA 与 CCDIB) 进行多酶复合物的构建。以构建基于 RIAD-RIDD 互作短肽的多酶复合物为例, 利用 (GGGGS)<sub>3</sub> (代表 3 段重复的 GGGGS 氨基酸序列) 作为 Linker, 将单个 RIAD 序列融合至 PyNP 酶的 N 端, 构建 pHT-P<sub>veg</sub>-RIAD-PyNP 质粒。其次, 利用 (GGGGS)<sub>3</sub>

Linker 将单个 RIDD 序列融合至 PNP 酶的 C 端, 构建 p43NMK-P<sub>43</sub>-PNP-RIDD 质粒。最后, 将 pHT-P<sub>veg</sub>-RIAD-PyNP 与 p43NMK-P<sub>43</sub>-PNP-RIDD 质粒依次转入 BS0 的感受态细胞。调控多酶复合物的催化亚基比例时, 在 pHT-P<sub>veg</sub>-RIAD-PyNP 质粒的 RIAD 序列 N 端继续融合多个 RIAD 序列, 或在 p43NMK-P<sub>43</sub>-PNP-RIDD 质粒的 RIDD 序列 C 端融合多个 RIDD 序列, 多个重复 RIAD 或 RIDD 序列之间无需添加 linker。

RBS 序列优化: 使用 RBS 预测网站“RBS calculator”(https://salislab.net/software/predict\_rbs\_calculator)设计 *PyNP1* 与 *PNP3* 基因相对应的最优 RBS 序列 RBS<sup>opPyNP</sup> 与 RBS<sup>opPNP</sup>。

引物设计与合成: 引物由 SnapGene 进行设计, 序列的合成与测序验证由安升达苏州实验室完成。本文所用引物的名称和序列如表 3 所示。

表 3 实验中所用引物的名称和序列  
Table 3 Name and sequence of primers used in the experiment

引物	序列 (5'→3')
deoD-U-F	TTAAATTTCTTCACTTTTTCAAAGTACTCTT
deoD-U-R	AGATTTACAGGAGGATATGAGATGATAAAATATATCAAGAGGCGTGC
deoD-D-F	TGATATATTTTATCATCTCATATCCTCCTGTAAATCTAAATT
deoD-D-R	TTTTTAGTGAAACATCTCCCGTTTTT
pHT-F1	TACCGGCGAATATCTGAGTAACTGCAGGTCGACGTCCC
pHT-F2	TATATGATAAGATCTCGTAACTGCAGGTCGACGTCC
pHT-R1	CTCTTGCGCTAAAAACATAAAATAAACCTCCTTTCTTTTACTTA
pHT-R2	TCAAATCTACCAATACGCATAAAATAAACCTCCTTTCTTTTACTTACC
PyNP1-F1	TAAGTAAAAGAAAGGAGGTTTATTTTATGTTTTTAGCGCAAGAGATT
PyNP1-F2	AAAAGAAAGGAGGTTTATTTTATGCGTATGGTAGATTTGATAGAGAA
PyNP1-R1	GGGGACGTCGACCTGCAGTTACTCAGATATTCGCCGGTATAC
PyNP1-R2	GGACGTCGACCTGCAGTTACGAGATCTTATCATATATTAGAGTCGGTG
p43NMK-F1	CTTTTTACGAAAGCTGGCGTAATGATGAAAGCTTGGCGTAATCA
p43NMK-F2	GTCAGAAATATGGCGAAAACTAATGATGAAAGCTTGGCGT
p43NMK-F3	CCGTTCTGCTGGGCGATAAAGAGTAATAATGATGAAAGCTTGGCGTAA

续表 3

引物	序列 (5'→3')
p43NMK-F4	TTTACATTCGGTATCACATAATAATGATGAAAGCTTGCGCT
p43NMK-R1	GAAGTGGCTGTCTGTCATAAAATAAACCTCCTTTCTTTACTTACCC
p43NMK-R2	AATCGCCGTCGGATTTCATAAAATAAACCTCCTTTCTTTACTTACCC
p43NMK-R3	ATGTGTGGGGTAGCCATAAAATAAACCTCCTTTCTTTACTTACCCCTC
p43NMK-R4	AGCACCTATATGTACACTCATAAAATAAACCTCCTTTCTTTACTTACCC
PNP-F1	AAAGAAAGGAGGTTTATTTTATGACAGACAGCCACTTCTCA
PNP-F2	AAAGAAAGGAGGTTTATTTTATGAATCGGACGGCGATT
PNP-F3	AAGAAAGGAGGTTTATTTTATGGCTACCCACACATTA
PNP-F4	GAAAGGAGGTTTATTTTATGAGTGTACATATAGGTGCTGA
PNP-R1	AGCTTTCATCATTACGCCAGCTTTCGTAATAAAG
PNP-R2	TTTCATCATTAGTTTTTCGCCATATTTCTGACAAT
PNP-R3	AAGCTTTCATCATTATTACTCTTTATCGCCAGCAG
PNP-R4	ACGCCAAGCTTTCATCATTATTATTGTGATACGGAATGTAAAGCCA

### 1.2.2 全细胞催化实验

将表 1 中本实验自行构建的重组菌株涂布于 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 12 h, 得到重组菌株单菌落。取形态较大、呈椭圆形的重组菌株单菌落接种于 20 mL 种子培养基中, 30 °C、250 r/min 培养 24 h, 然后将上述种子培养液以体积分数 10% 的接种量接至 50 mL 发酵培养基中, 30 °C、250 r/min 培养 72 h。将发酵液经冷冻离心机进行低温高速离心 (4 °C, 10000 r/min, 10 min) 以收集细胞, -20 °C 冷冻备用。

催化体系: 在 100 mL 反应瓶中, 底物脱氧胸苷 20 g (82.57 mmol) 和腺嘌呤 11.16 g (82.57 mmol) 以  $n(\text{脱氧胸苷}) : n(\text{腺嘌呤}) = 1 : 1$  投入至 300 mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH=7.0) 中 (反应体系总量为 100 mL), 加入质量浓度 (以催化反应体系体积计, 下同) 为 100 g/L 的细胞, 温度 40 °C, 转速 200 r/min 下恒温搅拌 2 h。

### 1.2.3 全细胞催化条件的优化

细胞添加质量浓度的优化: 在 100 mL 反应瓶中, 将底物脱氧胸苷 20 g (82.57 mmol) 和腺嘌呤 11.16 g (82.57 mmol) 以  $n(\text{脱氧胸苷}) : n(\text{腺嘌呤}) = 1 : 1$  投入至 50 mL 磷酸钠缓冲液 (300 mmol/L, pH 7.0) 中, 加入质量浓度分别为 50、100、150、200、250 g/L 的细胞, 充分搅拌后, 继续加入 300 mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 使催化反应体系总量为 100 mL。随后, 在温度 40 °C, 转速 200 r/min 条件下恒温搅拌 2 h 后, 用 HPLC 检测 dA 的含量以确定最适细胞添加质量浓度。

催化反应温度的优化: 在 100 mL 反应瓶中, 将底物脱氧胸苷 20 g (82.57 mmol) 和腺嘌呤 11.16 g (82.57 mmol) 以  $n(\text{脱氧胸苷}) : n(\text{腺嘌呤}) = 1 : 1$  投入至 50 mL 磷酸钠缓冲液 (300 mmol/L, pH 7.0) 中, 加入质量浓度为 150 g/L 的细胞, 充分搅拌后,

继续加入 300 mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 使催化反应体系总量为 100 mL。随后, 将全细胞催化体系分别置于 35、40、45、50、55、60 °C 下, 转速 200 r/min 下恒温搅拌 2 h 后, 用 HPLC 检测 dA 的含量以确定最适反应温度。

### 1.2.4 dA 含量及脱氧胸苷转化率测定

用高效液相色谱仪 (HPLC) 对脱氧胸苷及 dA 进行定量分析, 采用外标法, 根据 HPLC 谱图中脱氧胸苷和 dA 的峰面积计算催化反应液中脱氧胸苷和 dA 的含量<sup>[25]</sup>。催化反应结束后, 取 1 mL 反应液进行低温高速离心 (4 °C, 10000 r/min, 10 min) 沉淀细胞, 上清液经 0.25 μm 滤膜过滤, 用去离子水稀释 100 倍后作为待测样品, 对反应液中的脱氧胸苷和 dA 进行 HPLC 检测。测试条件为色谱柱: Inertsil ODS-3 (150 mm×4.6 mm×5 μm); 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL/min; 进样量 5 μL; 流动相 A: 20 mmol/L 磷酸二氢铵水溶液; 流动相 B: 甲醇, 线性梯度洗脱。并按下式计算脱氧胸苷的转化率:

$$\text{转化率} / \% = (c_1 / c_2) \times 100 \quad (1)$$

式中:  $c_1$  为催化反应后反应液中 dA 的浓度, mol/L;  $c_2$  为催化反应体系中脱氧胸苷的起始浓度, mol/L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 核苷磷酸化酶的组合表达及 RBS 优化

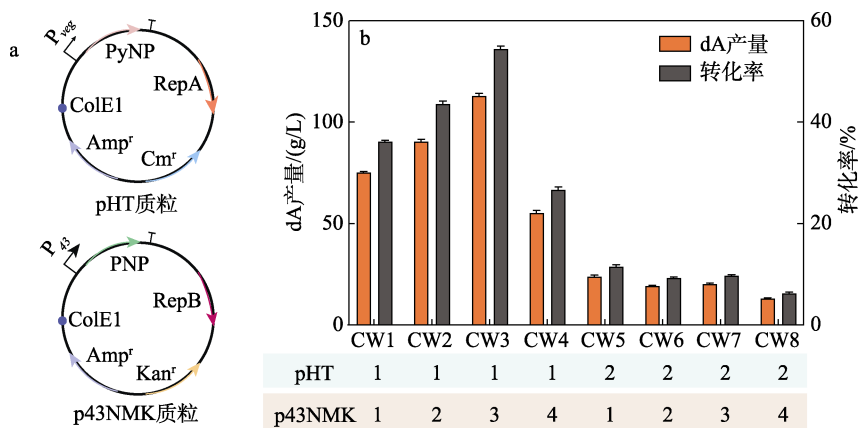
脱氧胸苷作为核糖基供体, 需经过嘧啶核苷磷酸化酶 (PyNP) 脱去胸腺嘧啶基团, 并在嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 的作用下, 以腺嘌呤为碱基供体, 催化合成 dA, 因此, dA 的合成需要 PyNP 与 PNP 的共同作用<sup>[20-24]</sup>。

不同宿主来源的核苷磷酸化酶其催化活性与特异性存在显著差异, 因此, 通过表达不同宿主来源

的核苷磷酸化酶以确定最适的组合。基于 *B. subtilis* 168 基因组数据查阅, 发现其具有内源性的 PNP (由基因 *deoD* 编码, Gene ID: 940038)。为了保证实验变量的唯一性, 首先利用表达敲除框对基因 *deoD* 进行敲除, 获得菌株 BS0。其次, 选择 pHT 质粒作为表达载体, 利用组成型启动子  $P_{veg}$  分别控制异源酶 PyNP1 (来源于 *E. coli*, Thymidine phosphorylase, Gene ID: 948901)、PyNP2 (来源于 *B. stearothermophilus* TH6-2, UniProtKB Sequence ID: P77836.1) 的表达, 获得重组质粒 pHT1 和 pHT2。之后, 选择 p43NMK 质粒作为表达载体, 利用组成型启动子  $P_{43}$  分别控制 PNP1 (来源于 *Citrobacter amalonaticus* ATCC25405, NCBI Sequence ID: BCU49562.1)、PNP2 (来源于 *B. stearothermophilus* TH6-2, UniProtKB Sequence ID: P77834.1)、PNP3

(来源于 *E. coli*, Gene ID: 945654)、PNP4 (来源于 *B. subtilis*) 的表达, 获得重组质粒 p43NMK1、p43NMK2、p43NMK3 和 p43NMK4 (图 1a)。将重组质粒 pHT 系列与 p43NMK 系列两两随机组合表达, 获得了重组菌株 CW1~CW8。然后, 将这 8 株重组菌株进行全细胞催化合成 dA, 以验证不同宿主来源的核苷磷酸化酶组合表达时 dA 的合成情况, 结果如图 1b 所示。

由图 1b 可以看出, 8 株重组菌株均能够转化脱氧胸苷和腺嘌呤生成 dA。然而, PyNP1 表达酶的 4 株重组菌株其产量与转化率均明显高于 PyNP2 表达酶的重组菌株。其中, CW3 菌株的 dA 产量最高, 为 113.1 g/L, 脱氧胸苷转化率为 54.5%。结果表明, 不同的核苷磷酸化酶组合表达能够显著影响 dA 的全细胞催化合成效果。



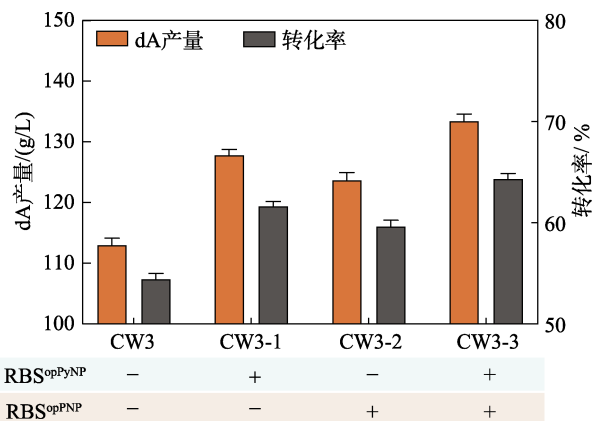
a—核苷磷酸化酶表达载体构建示意图; b—不同核苷磷酸化酶组合表达条件下 dA 的产量及脱氧胸苷转化率; pHT 中的 1 为来源于 *E. coli* 的 PyNP1 酶; pHT 中的 2 为来源于 *B. stearothermophilus* TH6-2 的 PyNP2 酶; p43NMK 中的 1 为来源于 *Citrobacter amalonaticus* ATCC25405 的 PNP1 酶; p43NMK 中的 2 为来源于 *B. stearothermophilus* TH6-2 的 PNP2 酶; p43NMK 中的 3 为来源于 *E. coli* 的 PNP3 酶; p43NMK 中的 4 为来源于 *B. subtilis* 的 PNP4 酶

图 1 不同来源的核苷磷酸化酶组合表达对 dA 产量及脱氧胸苷转化率的影响

Fig. 1 Effect of nucleoside phosphorylase combination expression from different sources on dA production and deoxythymidine conversion rate

为了进一步提高 dA 的产量及脱氧胸苷转化率, 对 CW3 菌株内的核苷磷酸化酶表达框中的 RBS 序列进行优化。使用 RBS calculator 分别设计酶 PyNP1 与 PNP3 的最优 RBS 序列, 获得了理论最优 RBS 序列  $RBS^{opPyNP}$  (对应酶 PyNP1): CCGGGGAAAA CTACCCCGCGAACGAAAAGGAGGTTTTATTT 与  $RBS^{opPNP}$  (对应酶 PNP3): CGAAATTTCTATCACG AGACCAGGAGGTATTTT。将 pHT1 质粒与 p43NMK3 质粒上的原始 RBS 序列分别替换为  $RBS^{opPyNP}$  和  $RBS^{opPNP}$ , 获得重组质粒 pHT1-1 与 p43NMK3-1, 并分别验证 RBS 序列优化对 dA 产量的影响, 结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出, 单独优化 PyNP1 (菌株 CW3-1) 或 PNP3 (菌株 CW3-2) 的重组菌株合成 dA 的能力均有明显提高。



“-”代表重组菌株未使用优化 RBS 序列; “+”代表重组菌株使用优化  $RBS^{opPyNP}/RBS^{opPNP}$  序列

图 2 优化 RBS 序列对 dA 产量及脱氧胸苷转化率的影响  
Fig. 2 Effect of optimizing RBS sequence on dA production and deoxythymidine conversion rate

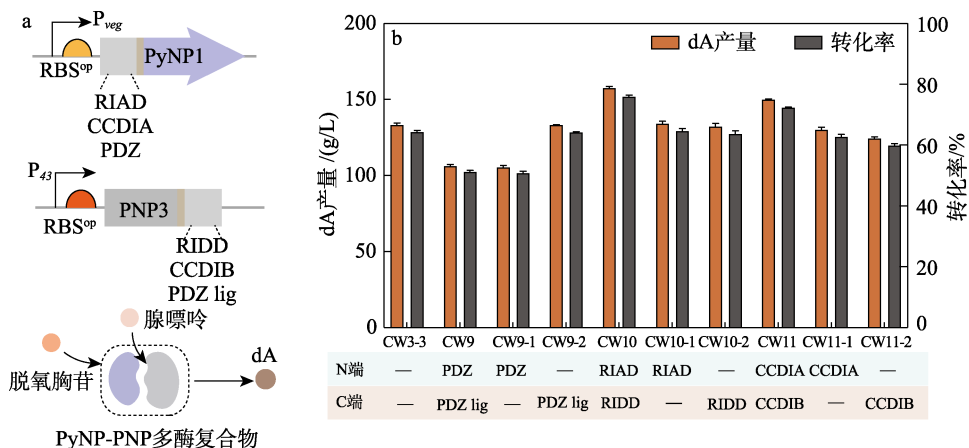
菌株 CW3-1 的脱氧胸苷转化率为 61.6%，dA 产量为 127.8 g/L，比菌株 CW3 产量（113.1 g/L）提高了 13.0%。由于单独优化酶 PyNP1 或 PNP3 的 RBS 序列时，dA 产量均有所改善，因此，将酶 PyNP1 和 PNP3 的 RBS 序列组合优化以验证其对 dA 产量和脱氧胸苷转化率的影响，菌株 CW3-3 的 dA 产量继续提升，达到 133.4 g/L，比菌株 CW3 产量提升了 17.9%，脱氧胸苷转化率为 64.3%。结果表明，通过优化表达框的 RBS 序列，提高起始翻译速率，能够实现目标酶 PyNP1 和 PNP3 的高效表达，最终提高 dA 的产量。

2.2 构建自组装多酶复合物提升催化效率

目前，利用互作短肽标签，构建空间上组织有序的多酶复合物能够有效改善多酶连续催化反应的整体效率<sup>[30-31]</sup>。本文拟利用互作短肽标签，将酶 PyNP1 与 PNP3 在胞内形成自组装多酶复合物，进一步提高 dA 的产量。选择 3 对不同的互作短肽标签（RIAD-RIDD、CCDIA-CCDIB、PDZ-PDZ lig）

进行构建表达，如图 3a 所示，分别将 RIAD、CCDIA 与 PDZ 标签融合至酶 PyNP1 的 N 端，将 RIDD、CCDIB、PDZ-lig 融合至 PNP3 的 C 端。

将含有自组装多肽标签的重组菌株进行催化合成 dA，结果如图 3b 所示。从图 3b 可以看出，含有 PDZ-PDZ lig 的重组菌株 CW9 的 dA 产量降至 106.5 g/L，脱氧胸苷转化率 51.3%，与单独表达 PDZ-PyNP1 的重组菌株 dA 合成能力类似，推测原因是 PDZ 标签融合至 PyNP1 酶的 N 端后，影响了 PyNP1 酶自身的催化活性，从而导致 dA 产量降低。与菌株 CW9 相反，重组菌株 CW10 与 CW11 的 dA 产量均有明显提高，其中菌株 CW10 的 dA 产量达到 156.7 g/L，比 CW3-3 菌株（133.4 g/L）提升了 17.5%。此外，单独表达 RIAD-PyNP1 或 PNP3-RIDD 的菌株其 dA 产量与 CW3-3 菌株相比并未出现明显变化，该结果佐证了菌株 CW10 的 dA 产量提升是因为胞内 PyNP1-PNP3 多酶复合物的成功构建。



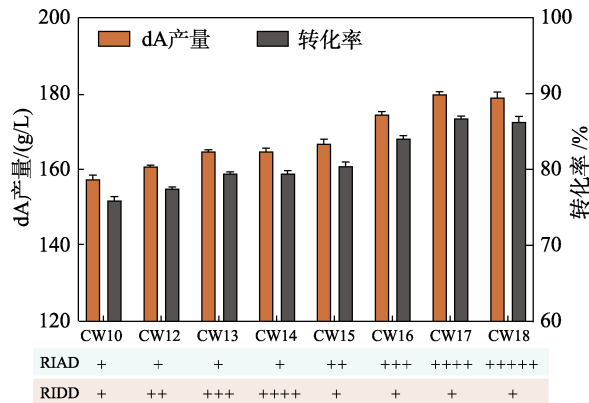
a—多酶复合体构建及工作原理示意图；b—不同多酶复合体对 dA 产量及脱氧胸苷转化率的影响；“-”代表酶的 N/C 端未融合互作短肽；PDZ/RIAD/CCDIA 代表在酶的 N 端融合了响应的互作短肽标签；PDZ lig/RIDD/CCDIB 代表在酶的 C 端融合了响应的互作短肽标签

图 3 构建多酶复合体对 dA 的产量及脱氧胸苷转化率的影响

Fig. 3 Effect of multi-enzyme complex construction on dA production and deoxythymidine conversion rate

此外，RIAD-RIDD 互作短肽标签可通过调节其催化亚基比例，调控多酶复合物体系内多个酶的化学计量比，从而进一步提高整体的催化效率。以菌株 CW10 为改造宿主，通过增加 RIAD 或 RIDD 标签的串联拷贝数实现 PyNP1-PNP3 多酶复合物的计量比调控，并对改造获得后的重组菌株 CW12~CW18 进行 dA 合成，结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出，当单独增加 RIDD 标签的串联拷贝数时，多酶复合物中的 PyNP1 酶数量增多，dA 产量略微升高，菌株 CW13 的 dA 产量达到 164.5 g/L。而单独增加 RIAD 标签的串联拷贝数时，dA 产量均有明显提升。当 PyNP1 酶的 N 端融合 4 个 RIAD 标签时，得到重组菌株 CW17，此时 dA 产量达到 179.6 g/L，与菌株 CW10（156.7 g/L）相比提升了 14.6%。



“+”的个数代表酶的 N/C 端融合的互作短肽数量

图 4 调节化学计量比对 dA 产量及脱氧胸苷转化率的影响  
Fig. 4 Effect of adjusted stoichiometric ratio on dA production and deoxythymidine conversion rate

结果表明, 调控 PyNP1-PNP3 多酶复合物的化学计量比, 增加多酶复合物内 PNP3 的数量, 能有效提高 dA 的催化合成效率。

### 2.3 全细胞催化合成 dA 的条件优化

细胞添加量在一定程度上反映出催化体系中核苷磷酸化酶的含量, 因此, 以催化反应体系总体积不变的前提下, 考察了重组菌株 CW17 不同细胞添加质量浓度 (50、100、150、200、250 g/L) 对 dA 产量及脱氧胸苷转化率的影响, 结果见图 5a。

由图 5a 可知, 当细胞添加质量浓度从 50 g/L 逐渐升至 250 g/L 时, dA 产量呈先升高后下降的趋势, 且在细胞添加质量浓度为 150 g/L 时, dA 的产量达到 186.5 g/L, 底物脱氧胸苷转化率为 89.6%。当催化体系中的细胞添加质量浓度超过 150 g/L 后, 催化体系中的全细胞浓度增加明显, 导致反应体系较为黏稠, 不利于全细胞和底物的充分混合接触, 相同反应时间内, 在一定程度上减缓了反应的进行, 从而导致催化产物量降低。此外, 以 150 g/L 的细胞添加质量浓度作为催化酶源, 不仅可实现较高的底物转化率, 而且菌体量适中, 能有效控制催化反应成本。因此, 细胞添加质量浓度定为 150 g/L。

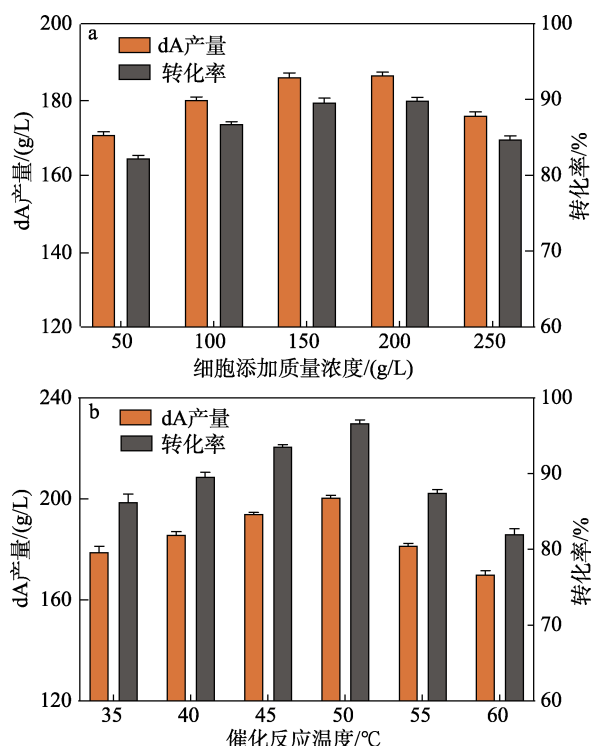


图 5 细胞添加质量浓度 (a) 与催化反应温度 (b) 对 dA 产量及脱氧胸苷转化率的影响

Fig. 5 Effects of cell addition mass concentration (a) and catalytic reaction temperature (b) on dA production and deoxythymidine conversion rate

温度是全细胞催化反应中较为重要的因素之一, 温度既可以影响酶蛋白空间结构又决定着各中

间产物的活化状态, 从而显著影响酶的催化活性和反应速率<sup>[32]</sup>。本实验中, 以重组菌株 CW17 为催化酶源, 添加质量浓度为 150 mg/L, 分别在 35、40、45、50、55、60 °C 下进行全细胞催化, 结果见图 5b。从图 5b 可以看出, 重组菌株 CW17 可适应的催化温度范围较广, 且当催化温度由 35 °C 逐步升高至 60 °C 时, 脱氧胸苷的转化率呈现出先升高后下降的趋势。当反应温度为 50 °C 时, dA 的产量最高, 为 200.3 g/L, 底物脱氧胸苷转化率为 96.6%。

### 3 结论

本文将 *E. coli* 来源的核苷磷酸化酶 PyNP1 和 PNP3 在 *B. subtilis* 中异源表达, 获得的重组菌株 CW3 在全细胞催化 2 h 后 dA 的产量为 113.1 g/L, 脱氧胸苷转化率为 54.5%。随后, 通过 RBS 序列优化策略, 并利用互作短肽构建多酶复合物进一步提高了 dA 的产量与底物转化率。在此基础上, 对催化体系中细胞添加质量浓度及催化反应温度进行了优化, 结果表明, 当重组菌株 CW17 细胞添加质量浓度为 150 g/L, 催化反应温度为 50 °C 时, dA 的产量达到 200.3 g/L, 底物脱氧腺胸苷的转化率为 96.6%。本研究为 dA 的绿色高效生产奠定了良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] FOX I H, KELLEY W N. The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells[J]. *Biochemistry of Review Annual*, 1978, 47(1): 655-686.
- [2] ULLMAN B, CLIFT S M, GUDAS L J, *et al.* Alterations in deoxyribonucleotide metabolism in cultured cells with ribonucleotide reductase activities refractory to feedback inhibition by 2'-deoxyadenosine triphosphate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(17): 8308-8314.
- [3] GENINI D, ADACHI S, CHAO Q, *et al.* Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria[J]. *Blood*, 2000, 96(10): 3537-3543.
- [4] CAMAIONI E, BOYER J L, MOHANRAM A, *et al.* Deoxyadenosine bisphosphate derivatives as potent antagonists at P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> receptors[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998, 41(2): 183-190.
- [5] KNIES C, REUTER H, HAMMERBACHER K, *et al.* Synthesis of new potential lipophilic co-drugs of 2-chloro-2'-deoxyadenosine (Cladribine, 2-CdA, Mavenclad<sup>®</sup>, Leustatin<sup>®</sup>) and 6-azauridine (z6U) with valproic acid[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2019, 16(3): e1800497.
- [6] FUKUSHIMA M, SUZUKI N, EMURA T, *et al.* Structure and activity of specific inhibitors of thymidine phosphorylase to potentiate the function of antitumor 2'-deoxyribonucleosides[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 59(10): 1227-1236.
- [7] PLOSHNIK D, RONICKE F, BEIKE H, *et al.* DNA primer extension with cyclopropenylated 7-deaza-2'-deoxyadenosine and efficient bioorthogonal labeling *in vitro* and in living cells[J]. *Chem Bio Chem*, 2018, 19(18): 1949-1953.
- [8] SHI S (时尚). Synthesis of 2'-dA derivatives[D]. Yantai: Ludong University (鲁东大学), 2019.



- [9] CARSON D A, WASSON D B, ESPARZA L M, *et al.* Oral antilymphocyte activity and induction of apoptosis by 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(7): 2970-2974.
- [10] GARG R, GUPTA S P, GAO H, *et al.* Comparative quantitative structure-activity relationship studies on anti-HIV drugs[J]. Reviews Chemical, 1999, 99: 3525-3601.
- [11] MICHAILIDIS E, MARCHAND B, KODAMA E N, *et al.* Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation-defective reverse transcriptase inhibitor[J]. Chemistry Biological of Journal, 2009, 284(51): 35681-35691.
- [12] DE CLERCQ E. Highlights in the discovery of antiviral drugs: A personal retrospective[J]. Chemistry Medicinal of Journal, 2010, 53(4): 1438-1450.
- [13] FLIEGERT R, BAUCHE A, PEREZ A M W, *et al.* 2'-Deoxyadenosine 5'-diphosphoribose is an endogenous TRPM2 superagonist[J]. Biology Chemical Nature, 2017, 13(9): 1036-1044.
- [14] LIU L, ZHOU M, PAN J. Composite hydrogel microspheres encapsulating hollow mesoporous imprinted nanoparticles for selective capture and separation of 2'-deoxyadenosine[J]. Molecules 2022, 27: 7444.
- [15] KAZIMIERCZUK Z, COTTAM H B, REVANKAR G R, *et al.* Synthesis of 2'-deoxytubercidin, 2'-deoxyadenosine, and related 2'-deoxynucleosides *via* a novel direct stereospecific sodium salt glycosylation procedure[J]. Journal of the American Chemical Society, 1984, 106(21): 6379-6382.
- [16] ZHAO H E (赵洪娥), CUI L (崔励). The purification of 2'-deoxyadenosine by crystallization[J]. Journal of Dalian Polytechnic University (大连工业大学学报), 2012, 31(2): 115-117.
- [17] KOMATSU H, AWANO H, ISHIBASHI H, *et al.* Development of chemo-enzymatic process and manufacture of deoxynucleosides[C]// Nucleic Acids Symposium Series. Oxford University Press, 2001, 1(1): 49-50.
- [18] LU Y C (路有昌), ZHANG H P (张换平). Synthesis of 2'-deoxyadenosine[J]. Applied Chemical Industry (应用化工), 2006, 35(7): 564-565.
- [19] JIANG Z L (蒋忠良), LI Q K (李乾坤), QI X B (齐湘兵), *et al.* Synthesis research of 2'-deoxyadenosine[J]. Journal of Tongji University: Natural Science (同济大学学报: 自然科学版), 2007, (9): 1264-1268.
- [20] WANG J K (王建琨). Synthesizing 2'-deoxyadenosine by microbial transformation method[D]. Xinxiang: Henan Normal University (河南师范大学), 2011.
- [21] FERNANDEZ-LUCAS J, CONDEZO L A, QUEZADA M A, *et al.* Low-temperature synthesis of 2'-deoxyadenosine using immobilized psychrotrophic microorganisms[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2008, 100(2): 213-222.
- [22] CARDINAUD R, HOLGUIN J. Nucleoside deoxyribosyltransferase-II from *Lactobacillus helveticus* substrate specificity studies pyrimidine bases as acceptors[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 1979, 568(2): 339-347.
- [23] FERNANDEZ-LUCAS J, CONDEZO L A, MARTINEZ-LAGOS F, *et al.* Synthesis of 2'-deoxyribosyl nucleosides using new 2'-deoxyribosyltransferase microorganism producers[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(5): 1147-1155.
- [24] HONG Y H (洪云海), DING Q B (丁庆豹), OU L (欧伶), *et al.* Enzymatic synthesis of 2'-deoxyadenosine by *Brevibacterium acetylum*[J]. Industrial Microbiology (工业微生物), 2006, (1): 30-33.
- [25] LIU G S (刘国生), CHEN L (陈琳), XING S T (邢善涛), *et al.* Synthesis of  $\beta$ -2'-deoxyadenosine from  $\beta$ -2'-deoxythymidine by immobilized cells[J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals, 2012, 33(5): 563-567.
- [26] LIANG S H, LI W Z, GAO T, *et al.* Enzymatic synthesis of 2'-deoxyadenosine and 6-methylpurine-2'-deoxyriboside by *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  overexpressing nucleoside phosphorylases from *Escherichia coli* BL21[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(2): 165-168.
- [27] DRENICHEV M S, OSLOVSKY V E, ZENCHENKO A A, *et al.* Comparative analysis of enzymatic transglycosylation using *E. coli* nucleoside phosphorylases: A synthetic concept for the preparation of purine modified 2'-deoxyribonucleosides from ribonucleosides[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2795.
- [28] LIU X D (刘袖洞), WU C K (吴春凯), PEI J (裴婕). Research progress of cell immobilization catalysis in fine chemicals production[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(4): 657-664, 805.
- [29] WU Y, CHEN T, LIU Y, *et al.* Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis*[J]. Research Acids Nucleic, 2020, 48(2): 996-1009.
- [30] KANG W, MA T, LIU M, *et al.* Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4248.
- [31] WAN L, ZHU Y, CHEN G, *et al.* Efficient production of 2'-fucosyllactose from L-fucose *via* self-assembling multienzyme complexes in engineered *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(10): 2488-2498.
- [32] PAN X R (潘鑫茹), LIU J Z (刘均忠), ZHANG H J (张宏娟), *et al.* Synthesis of L-theanine by whole cell catalyst co-expressing PPK and GMAS[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2019, 36(9): 1827-1832.