

构建重组枯草芽孢杆菌催化制备 D-对羟基苯甘氨酸

李法彬 刘 露 杜 燕 班 睿*

(天津大学化工学院 天津大学系统生物工程教育部重点实验室 天津 300350)

摘要 目的:在 *Bacillus subtilis* 中表达异源 D-海因酶基因(*hyd*)和 D-氨甲酰水解酶基因(*adc*),构建重组细胞作为催化剂,用于生产 D-对羟基苯甘氨酸(D-HPG)。方法:构建 *hyd* 表达质粒,考察培养基中二价金属离子对 D-海因酶活性的影响。过表达 *acoR* 基因,考察 AcoR 蛋白胞内水平与 *P_{acoA}-hyd* 基因拷贝数的关系。筛选表达 *adc* 基因的启动子,构建 *hyd* 和 *adc* 基因共表达质粒,考察双酶活性菌株的催化特性。结果:成功构建了海因酶表达质粒 pHPS 和 pUBS,培养基中添加 0.8mmol/L 的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$,使 168N/pUBS 菌株的 D-海因酶活性达到 956U/gDCW。整合表达 *P_{cdt}-acoR* 基因,使 LSL02/pUBS 菌株的 D-海因酶活性达到 1 470U/gDCW。单拷贝 *P_{AE}-adc* 基因的表达水平相对最高。双酶共表达质粒 pUBSC 被成功构建,菌株 LSL02/pUBSC 的最适催化温度为 40℃~45℃,催化活性能够持续 12h,当底物起始浓度为 20g/L 时,反应 12h 生成的 D-HPG 达到 14.32g/L,转化率达到 95%,收率超过 80%。结论:构建具有 D-海因酶和 D-氨甲酰水解酶双酶活性的重组 *Bacillus subtilis* 作为全细胞催化剂,用于海因酶法生产 D-HPG,具有技术上的可行性和优势。

关键词 枯草芽孢杆菌 D-海因酶 D-氨甲酰水解酶 表达质粒 D-对羟基苯甘氨酸

中图分类号 Q78

D-对羟基苯甘氨酸(D-HPG)作为医药中间体,主要用于半合成羟氨苄青霉素、头孢羟氨苄和头孢哌酮等抗生素^[1]。以 D,L-对羟基苯海因(D,L-HPH)为底物,在 D-海因酶(D-hydantoinase, DHase)和 D-氨甲酰水解酶(D-carbamoylase, DCase)催化下,经中间物 N-氨甲酰基-D-对羟基苯甘氨酸(D-CpHPG),生成光学纯的 D-HPG 的反应(图 1),被称为生产 D-HPG 的海因酶法^[2-3]。在碱性反应条件下, D, L-HPH 能够自发消旋^[4]。所以, D, L-HPH 能够完全被转化,一般不需要另外的消旋酶参与。

D-海因酶(EC 3.5.2.2)属于酰胺水解酶家族,存在于 *Brevibacillus*、*Bacillus*、*Agrobacterium* 和 *Pseudomonas* 等微生物中^[5]。微生物来源的 D-海因酶一般为同源二聚体或四聚体,亚基分子量在 40kDa~60kDa 之间,大约包括 450 个左右的氨基酸残基^[6-7]。多数 D-海因酶的活性

中心由 His、Asp、Val 和羧基化的 Lys 构成,一般对 D-5'-取代海因都有催化活性。活性中心 Lys 羧基化的两个氧原子分别与两个 Zn^{2+} 配位,所以 D-海因酶是金属依赖性酶^[8]。当 D, L-HPH 作为底物时, D-海因酶的比活性通常在 10U/mg~100U/mg 之间。来自 *Bacillus stearothermophilus* SD-1 的 D-海因酶(*hyd* 基因)热稳定性突出,80℃的半衰期为 30min; K_m 值 47.2mmol/L,比活力约为 23.0U/mg^[9],能够满足海因酶法生产 D-HPG 的需要,通常被优先选择用于海因酶法生产 D-HPG。

D-氨甲酰水解酶(EC 3.5.1.77)在 *Agrobacterium*、*Arthrobacter*、*Blastobacter*、*Comamonas*、*Pseudomonas*、*Sinorhizobium*、*Flavobacterium* 和 *Pasteurella* 等微生物中都有发现^[10],也属于酰胺水解酶家族。D-氨甲酰水解酶对底物有立体选择性,专一性催化 N-氨甲酰基-D-氨基酸的酰胺键水解,生成相应的 D-氨基酸。D-氨甲酰水解酶多为同源四聚体,亚基分子量在 35kDa 左右,包含 300 多个氨基酸残基,活性中心由 Glu46, Lys126 和 Cys171 残基构成。已研究的 D-氨甲酰水解酶都有热稳

收稿日期:2018-09-20 修回日期:2018-11-05

* 通讯作者,电子邮箱:rbprofessor@163.com

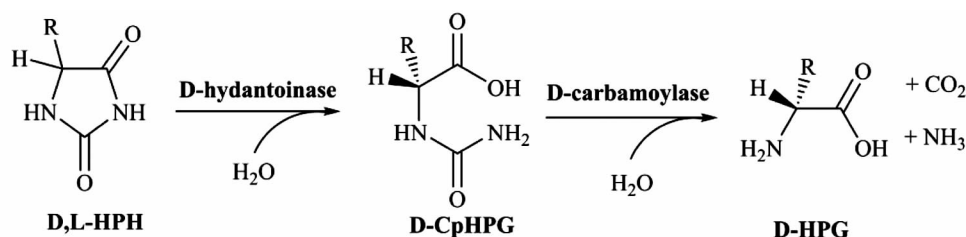


图1 D, L-HPH 生成 D-HPG 的双酶催化反应过程

Fig.1 The double-enzyme catalyzed reaction process of D-HPG produced by DL-HPH

定性差和容易氧化失活的缺陷,其比活性通常在 7 ~ 22U/mg 之间。来自 *Agrobacterium* sp. KNK712 的 D-氨甲酰水解酶^[11] (*adc* 基因),由于酶学研究相对充分,通常被选择用于双酶法催化生产 D-HPG。

海因酶法生产 D-HPG 的工艺主要可分为两种:一种是以固定化酶或固定化细胞作为催化剂;另一种是以游离的全细胞作为催化剂。后者具有催化剂制备工艺简单和成本低的优势,应用前景更好。天然具有双酶活性的微生物,因双酶活性低而不能满足应用需要。诱变育种筛选的高酶活性突变株,往往伴随生长缺陷或生物量过低,也难以满足应用需要。采用基因工程育种技术构建重组菌,是可行的技术选择。迄今为止,几乎所有以表达 D-海因酶和 D-氨甲酰水解酶为目的的重组菌构建,都选择 *Escherichia coli* 作为宿主细胞^[12-14]。重组的全细胞催化活性虽然能够达到应用要求,但是,重组 *Escherichia coli* 在大规模培养方面存在技术困难,例如:溶氧限制问题,诱导物成本问题,包涵体形成问题等^[15-16],限制它的工业应用,而重组 *Bacillus subtilis* 可能是一个正确的选择。

前期研究已经证实,异源 D-海因酶和 D-氨甲酰水解酶都能够在 *Bacillus subtilis* 中表达^[17]。本研究将进一步优化 D-海因酶和 D-氨甲酰水解酶的表达方式和条件,完善双酶共表达重组 *Bacillus subtilis* 菌株的构建,并表征重组菌的全细胞催化特性。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验中所用菌株和质粒详见表 1。

1.2 培养基及菌株培养方法

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母提取物 5,NaCl 10,pH 7.5;需要时加入终浓度 15mg/L 新霉素,或 6mg/L 氯霉素,或 50mg/L 博来霉素(北京索莱宝科技有限公司)。SPM 培养基(g/L):烘焙豆粉 20,酵母粉

5,MgSO₄ · 7H₂O 0.3,K₂HPO₄ 2,NaCl 5,MnCl₂ · 4H₂O 0.16,pH 7.2。菌株活化、种子培养和一般培养使用 LB 培养基;表达 D-海因酶和 D-氨甲酰水解酶,以及测量细胞催化活性,使用 LB 培养基或 SPM 培养基。培养基装液量为 30ml/250 ml 摇瓶,12h 种龄的种子接种量为 2%,37℃,220r/min 培养;在培养至 6h 时,加入终浓度为 3g/L 的羟基丁酮(Alfa Aesar 公司)诱导 D-海因酶基因表达。生物量的测定采用显微全菌计数法,并按照 1.42 × 10¹² cell 约等于 1.0 gDCW,核定为细胞干重(DCW)。

1.3 基因操作方法

引物 DNA 合成和 DNA 测序均委托北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。其余 DNA 片段均来自 *Bacillus subtilis* 染色体的 PCR 扩增,Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 购自南京诺唯赞生物科技有限公司和 Hifi DNA Polymerase 购自北京金式金生物技术有限公司。dNTP 购自 Thermo scientific 公司。DNA 片段的 PCR 拼接参照方法^[18],DNA 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Thermo scientific 公司,操作方法参照使用说明书。多功能 DNA 纯化回收试剂盒购自北京博迈德生物技术有限公司。感受态细胞制备和转化方法均参照 Spizizen 方法^[19]。基因在 *B. subtilis* 染色体上的整合,采用无标记基因修饰方法^[20]。以 P_{cdd}-*adc* 基因在 *pel* 位点的整合为例进行说明:从 *B. subtilis* 168 染色体上,分别用引物 *pelU1*/*pelU2*、*AP1s*/*AP2s* 扩增上游同源臂(U,1 261bp)、*cdd* 基因的启动子及前导区(P_{cdd},232bp);从质粒 pHG-cdh 上,用引物 *peladcA* / *peladcB* 扩增 *adc* 基因(N,1 128bp);从 *B. subtilis* BNAY6m 染色体上,用引物 *pelD1*/*pelG2* 扩增内部同源片段、正向选择盒和下游同源臂(DCRG,3 320bp)。将上述 4 个片段通过融合 PCR 方法拼接为 UPNDCRG 片段(5 941bp),用 UPNDCRG 片段转化 *B. subtilis* 168N 感受态细胞,用氯霉素抗性平板筛选抗性菌株。经

表 1 本研究所用的菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids		Characteristics	Source
Strains			
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>		Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> 168N	<i>trpC2</i> , $\Delta araR::P_{ara-neo}$		Laboratory stock
<i>E. coli</i> DH5 α	Host for shuttle plasmid construction		Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> BNAY6m	<i>trpC2</i> , $\Delta araR::P_{ara-neo}$, $\Delta nprE$, $\Delta aprE$, $\Delta yola-yolB$, $\Delta xynA$, Δcsn , $\Delta yncM$, Δpel		Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> LSL10	<i>B. subtilis</i> 168N, $\Delta acoA::P_{acoA-hyd}$		This study
<i>B. subtilis</i> LSL10	<i>B. subtilis</i> LSL10, $\Delta yola::sigL$		This study
<i>B. subtilis</i> LSL	<i>B. subtilis</i> 168N, $\Delta yola::sigL$		This study
<i>B. subtilis</i> LSL11	<i>B. subtilis</i> LSL10, $\Delta sacB::acoR$		This study
<i>B. subtilis</i> LSL12	<i>B. subtilis</i> LSL10, $\Delta sacB::P_{edd-acoR}$		This study
<i>B. subtilis</i> LSL13	<i>B. subtilis</i> LSL10, $\Delta sacB::P_{AE-acoR}$		This study
<i>B. subtilis</i> LSL01	<i>B. subtilis</i> LSL, $\Delta sacB::acoR$		This study
<i>B. subtilis</i> LSL02	<i>B. subtilis</i> LSL, $\Delta sacB::P_{edd-acoR}$		This study
<i>B. subtilis</i> LSL03	<i>B. subtilis</i> LSL, $\Delta sacB::P_{AE-acoR}$		This study
<i>B. subtilis</i> LN01	<i>B. subtilis</i> 168N, $\Delta pel::P_{edd-adc}$		This study
<i>B. subtilis</i> LN02	<i>B. subtilis</i> 168N, $\Delta pel::P_{spvG-adc}$		This study
<i>B. subtilis</i> LN03	<i>B. subtilis</i> 168N, $\Delta pel::P_{lytR-adc}$		This study
<i>B. subtilis</i> LN04	<i>B. subtilis</i> 168N, $\Delta pel::P_{AE-adc}$		This study
pHP13	Cm ^R , Em ^R in <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i>		Laboratory stock
pUB110	Km ^R , Blm ^R in <i>B. subtilis</i>		Laboratory stock
pHG-sdl	Amp ^R , containing the <i>hyd</i> gene(<i>Bacillus stearothermophilus</i> SD-1)		Laboratory stock
pHG-cdh	Amp ^R , containing the <i>adc</i> gene(<i>Agrobacterium</i> sp. KNK712)		Laboratory stock
pHPS	pHP13 derivative, containing the <i>hyd</i> gene, downstream of the promoter P_{acoA}		This study
pUBS	pUB110 derivative, containing the <i>hyd</i> gene, downstream of the promoter P_{acoA}		This study
pUBSC	pUB110 derivative, containing the <i>hyd</i> and <i>adc</i> gene, downstream of the promoter P_{acoA} and P_{AE} respectively		This study

PCR 扩增和抗性验证后,将氯霉素抗性菌转接 LB 培养基,37℃,220r/min 培养 4h 后,用新霉素抗性平板筛选转化子。转化子经 PCR 扩增和 DNA 测序验证,得到 $P_{cda-adc}$ 基因整合在 *pel* 位点的重组菌株 LN01。其余基因或 DNA 片段在 *Bacillus subtilis* 染色体上的整合,均采用相同的方法。表 2 为本研究所用的引物。

1.4 qRT-PCR 分析方法

用 LB 培养基培养待测菌株,收集 16h 细胞,提取细胞总 RNA(天根生化科技,提取试剂盒),扩增 cDNA 第一链(Roche)和 RT-PCR 扩增(Roche Light Cycler 480),测定 Ct 值。以 *B. subtilis* 的 *ccpA* 作为参比基因,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[21]计算待测基因的 mRNA 胞内相对水平。

1.5 胞内蛋白提取和 SDS-PAGE 分析

取 2ml 发酵液,13 000 r/min 离心 2min,去除上清液,充分洗涤细胞沉淀;用 500 μ l 无菌水重悬细胞,并转移至破碎离心管,加入 200 μ l 玻璃珠,用匀浆破碎机(FastPrep FP120)破碎细胞;每次破碎 45s,取出置于冰盒上,间隔 2min,共破碎 30 次。细胞破碎液 4℃,6 000r/min 离心 8min,取上清液,加入 4 倍体积冷无水乙醇,静置沉淀蛋白质。13 000r/min 离心 8min,去上清液,沉淀置 37℃干燥;加入 30 μ l 无菌水溶解沉淀,得到胞内蛋白提取液。加入等体积的 2 \times loading buffer,震荡混匀,沸水浴中 10min,冷却,离心使集中到管底,取样 20 μ l 上样,进行 SDS-PAGE。

表 2 本研究所用引物
Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
ASU1	ATCTCGTTTCGGGAAATTAC	20
ASU2	TCAGTCTTCTCATCTTCACT	20
Sd1	AGTGAAGATGAGAAGACTGA	20
Sd2	GCGACATCCTCACCAGATCAACAATCACAATGGAGGACAAT	40
ASD1	TTGATCGGTGAGGATGTCGC	20
ASD2	ATGGGTGCTTTAGTTGAAGATTATCTGCTGTCGGCAAAT	39
CR1/ CR2	TCTTCAACTAAAGCACCCAT/TTATTCATTCACTTTTCGTG	20/20
ASG1	CACGAAAACGAATGAATAACACATTGCGGATCTTGATAA	40
ASG2	CCATCTCTTACATTCTCCTT	21
PHSD1	CCCAAGCTTAACGGCACGATAGACTGTATG	30
PHSD2	CGGGATCCCAATCACAATGGAGGACAATATG	31
PURS1	AAAACGTCAGCAATCACAATGGAGGACAATATG	33
PURS2	AACGGCACGATAGACTGTATG	21
PUB1	CATACAGTCTATCGTGCCGTTAGTGCCGACCAAAACCATAAAAC	44
PUB2	AAAACGTCAGCAGCACAATTCCAAGAAAAACA	32
sacBU1	TCCTCATAGCCAAGAATCC	19
sacBU2	GCAATGTTTCCGATAAAGTCTGCTAGCCGTGATAGTT	37
PacoR1/ PacoR2	GACTTTATCGGAAACATTGC/AATAGGAACGCCGTTATATG	20/20
AP1/AP2	GACAAACATCACGCTCTTG/GTGTAATTCCTCCCTTACCT	19/21
sacBUAE	GATCAGTATATCACAGCGTTCTTGCTAGCCGTGATAGTT	39
sacBPAE1	AGAACGCTGTGATATACTGATC	22
sacBpAE2	CGTTTGGGACCGAGTTCATTTTACCCTCTCCTTTT	37
acoR1	ATGAACTCGGTCCCAAACG	19
sacBD1	CATATAACGGCGTTCTATTTTGATCCTAACGATGTAACC	40
sacBG2	GGAGTCAGTGAACAGGTAC	19
pelU1/ pelU2	CGTTGTATTCTGGCTTGAT/TGTTCCGCTATCCTATTGC	40
AP1s	GCAATAGGATAGCGGAACAGACAAACATCACGCTCTTG	38
AP2s	AAGTATCATCTGACGTGTCATGTGTAATAATTCCTCCCTTACCT	
spoVG1	GCAATAGGATAGCGGAACATGCGGAAGTAAACGAAGTG	38
spoVG2	GTGTACATTTACCTCCTTTCTATATAAAAGCATTAGTGT	40
peladA /peladB	ATGACACGTCAGATGATACCT/GCATCGTTGACTGAATAGC	42
pelD1	TACCAAGGAGGAGTTATAGCGGATCAAGTGACAGCAA	37
pelG2	AGTTAGCACCGTTGGAAG	18
lytRU1/ lytRU2	CTACACTATCACTGACGCTAA/AAATTACTTTTATTATGAG	21/19
AEC1/ AEC2	AGAACGCTGTGATATACTGATC/GCATCGTTGACTGAATAGC	22/20
PUBR1	CGGGATCCCAGCACAATTCCAAGAAAAACA	30
PUBC2	GATCAGTATATCACAGCGTTCTAGTGCCGACCAAAACCATAAAAC	45
ade1	AGAACGCTGTGATATACTGATC	22
cdh2	CATACAGTCTATCGTGCCGTTGCTATATACTCCTCCTTGGA	42
acoA1	AACGGCACGATAGACTGTATG	21
hyd2	CGGGATCCCAATCACAATGGAGGACAATATG	31

1.6 D,L-HPH 转化反应及全细胞催化活性测定方法

D,L-HPH 和 D-HPG 的含量利用高效液相色谱仪 (Agilent 1260 Infinity Quaternary LC) 进行测定。所用色谱柱为:Agilent ZORBAX SB-C18-5 μ m(4.6mm \times 150mm) 色谱柱;流动相为 φ (50mmol/L, pH4.2, 乙酸-乙酸钠): φ (甲醇) = 90:10(体积比), 流速0.5ml/min, 进样量10 μ l, 柱温30 $^{\circ}$ C;检测器为紫外检测器, 检测波长254nm。

D-海因酶活性的测定:取0.2ml 细胞培养液, 13 000r/min离心3min, 收集菌体;用50mmol/L, pH8.0 的 Tris \cdot HCl 缓冲液洗涤菌体两次, 用2ml 0.3% D,L-HPH(溶于 Tris \cdot HCl 缓冲液)重悬, 置于40 $^{\circ}$ C 水浴, 振荡反应30min, 加入10 μ l 的6mol/L HCl 终止反应。取上清液用 HPLC 定量测定 D,L-HPH 的含量, 根据公式 $U/gDCW = 1.42 \times c \div (192.17 \times 30 \times n) \times 10^4$ 计算酶活单位, c 代表 D,L-HPH 的消耗量 (mg/L), n 代表每毫升发酵液生物量 ($\times 10^9$ 个)。1 个 D-海因酶催化活性单位 (U) 定义为:在 1min 内 1g 干细胞水解 1mmol/L 的 D-HPH 生成 D-cpHPG 所需要的酶量。

D-氨甲酰水解酶活性的测定:取2ml 细胞沉淀用等体积的 15mmol/L 的 D-CpHPG 反应液重悬, 置于40 $^{\circ}$ C 水浴, 振荡反应60min, 加入10 μ l 的6mol/L HCl 终止反应测定 D-氨甲酰水解酶活性。取上清液用 HPLC 定量测定 D-HPG 的含量, 根据公式 $U/gDCW = 1.42 \times c \div (167.16 \times 60 \times n) \times 10^3$ 计算酶活单位, c 代表 D-

HPG 的生成量 (mg/L), n 代表每毫升发酵液生物量 ($\times 10^9$ 个)。1 个 D-氨甲酰水解酶催化活性单位 (U) 定义为:1min 内 1g 干细胞水解 D-cpHPG 生成 1mmol/L 的 D-HPG 所需要的酶量。

全细胞作为海因酶法催化剂的双酶催化活性测定参照 D-海因酶活性的测定方法, 1 个双酶催化活性单位定义为:1min 内 1g 干细胞水解 D-HPH 生成 1mmol/L 的 D-HPG 所需要的酶量。

2 结果和分析

2.1 D-海因酶基因在 *Bacillus subtilis* 中的表达

从质粒 pHG-sd1 上扩增 D-海因酶基因 *hyd*, 替换 *B. subtilis* 168N 染色体上 *acoA* 基因的编码序列, 构成整合的 P_{acoA} -*hyd* 基因, 得到重组菌 LS10。从 LS10 染色体上再扩增出 P_{acoA} -*hyd* 基因, 两端分别引入 *Hind* III 与 *Bam* HI 酶切位点, 与质粒 pHPI3 酶切连接, 形成低拷贝 D-海因酶表达质粒 pHPS (图 2a)。质粒 pHPS 转化 *B. subtilis* 168N, 得到菌株 168N/pHPS。从质粒 pUB110 上扩增包括复制区 *rep*、卡那霉素抗性基因 *kmr* 和博来霉素抗性基因 *blm*^[22], 与 P_{acoA} -*hyd* 基因 PCR 拼接, 同时在两端引入 *Pst* I 酶切位点。拼接序列经酶切和连接后, 形成多拷贝 D-海因酶表达质粒 pUBS (图 2b)。质粒 pUBS 转化菌株 168N, 经博来霉素抗性筛选, 得到 168N/pUBS 菌株。

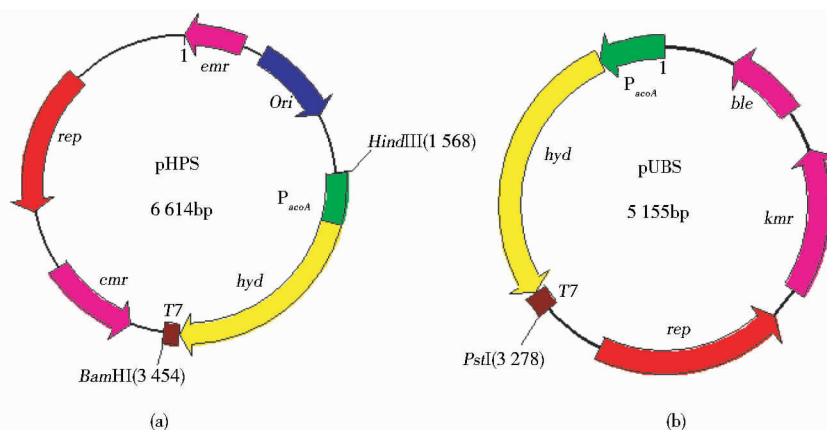


图2 D-海因酶表达质粒 pHPS (a) 和 pUBS (b) 的结构示意图

Fig.2 The schematic of D-hydantoinase expression plasmids pHPS(a) and pUBS(b)

用 LB 培养基分别培养菌株 LS10、168N/pHPS 和 168N/pUBS, 收集 24h 培养物作为全细胞催化剂, 进行 D,L-HPH 转化反应。在反应 60min 的反应液中, 加入

10% 的对二甲氨基苯甲醛 (PDAB) 试剂, 反应液呈现黄色, 表明有产物 D-CpHPG 生成。反应液的 HPLC 色谱图显示 (图 3a), 反应之前, 反应液中只有保留时间

7.60min 的 D,L-HPH 峰(蓝色);反应 60min 后,反应液中的 D,L-HPH 峰面积减小,同时在保留时间 3.45min 处出现 D-CpHPG 色谱峰(红色)。分别提取菌株 LS10、168N/pHPS 和 168N/pUBS 的胞内蛋白,并进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示(图 3b),菌株 168N/pHPS

和 168N/pUBS 在大约 54kDa 处均有明显条带,大小与 D-海因酶单体相近;条带亮度随 P_{acoA} -*hyd* 基因拷贝数增加而增加。结果表明, P_{acoA} -*hyd* 基因无论整合在染色体上,还是位于表达质粒上,都能够被诱导表达,并赋予宿主细胞 D-海因酶活性。

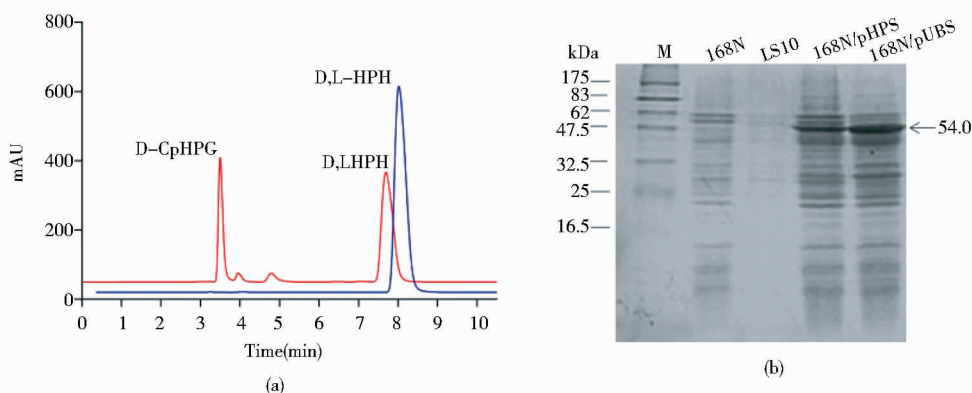


图 3 反应前后反应液的 HPLC 分析图谱 (a) 和重组菌株胞内蛋白的 SDS-PAGE 分析 (b)

Fig. 3 Chromatogram of solution before and after reaction (a) and SDS-PAGE analysis of intracellular proteins of recombinant strains (b)

The blue and red line refer to the solution before and after reaction, respectively

2.2 二价金属离子对 D-海因酶活性的影响

D-海因酶属于金属酶小亚族,*hyd*_{SD-1} 的晶体结构显示每个亚基羧基化的 Lys¹⁵⁰ 均结合 2 个 Zn²⁺, 而较早研究表明该酶在含 Mn²⁺ 的缓冲液中活性稳定^[11], 二价金属离子可能对其活性有重要影响。在 LB 培养基中分别添加不同浓度的 FeCl₂ · 4H₂O、MgSO₄ · 7H₂O、ZnSO₄ · 7H₂O 和 MnCl₂ · 4H₂O, 以 EDTA 作为对照, 用于培养 168N/pUBS 菌株。收集 24h 菌龄细胞, 分别测定其生物量, 均在 1.6 × 10⁹ ~ 2.0 × 10⁹ 个/ml, 细胞生长没有出现明显差异, 并测定其 D-海因酶活性。结果显示(图 4), 在 EDTA 的对照组中, D-海因酶活性最低, 且随添加浓度的增加酶活性下降; FeCl₂ 轻微抑制 D-海因酶活性; MgSO₄ 无明显效应; ZnSO₄ 有明显激活作用, 但超过 0.2mmol/L 的 ZnSO₄ 产生抑制作用; 在 0.2 ~ 1.0mmol/L 的浓度范围内, MnCl₂ 对 D-海因酶活性都有强烈的激活作用, 其中添加 0.8mmol/L 的 MnCl₂ · 4H₂O, 使菌株 168N/pUBS 的 D-海因酶活性提高 10 倍以上, 达到 956U/gDCW。

2.3 *acoR* 基因表达水平与 D-海因酶活性的关系

P_{acoA} 是依赖 σ^L 的启动子, 其转录还需要 AcoR 蛋白激活和羟基丁酮诱导^[23]。在多拷贝 P_{acoA} -*hyd* 基因存在情况下, 胞内固有的 AcoR 蛋白水平可能不能满足所有

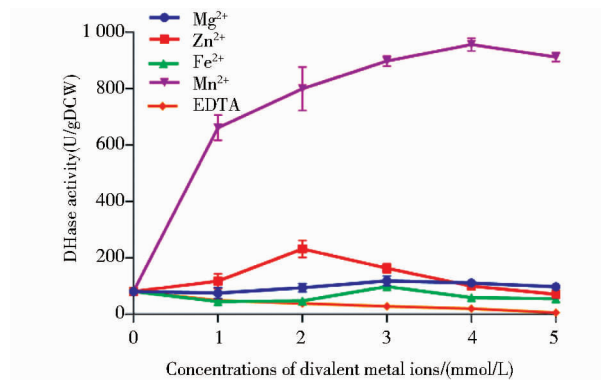


图 4 二价金属离子对 D-海因酶活性的影响

Fig. 4 The effects of divalent metal ions on D-hydantoinase activity

The concentration gradient (mmol/L) of metal ions in medium is as follows: Fe²⁺ and Mn²⁺, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0; Mg²⁺ and EDTA, 2, 4, 6, 8, 10; Zn²⁺, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5

P_{acoA} -*hyd* 基因充分激活的需要^[24]。分别在 *sigL* 基因双拷贝的 LSL10 和 LSL 菌株中, 在染色体 *sacB* 位点, 整合一个野生型 *acoR* 基因拷贝, 构建菌株 LSL11 和 LSL01; 整合一个 P_{cdd} -*acoR* (*acoR_c*) 基因拷贝, 构建菌株 LSL12 和 LSL02; 整合一个 P_{AE} -*acoR* (*acoR_a*) 基因拷贝, 构建菌株 LSL13 和 LSL03^[25], 使 *acoR* 基因不同程度的过表

达。qRT-PCR 分析显示(表 3),菌株 LSL01、02 和 03 胞内 *acoR* 基因的 mRNA 水平,较对照菌株 LSL,分别提高 2.11、63.56 和 302.33 倍。据此判断,在 LSL11 ~ 13 和 LSL01 ~ 03 系列菌株中,*acoR* 基因被不同程度的过表达。

表 3 重组菌株 *acoR* 基因的 qRT-PCR 转录分析

Table 3 The transcription analysis of *acoR* using qRT-PCR

Strains(genotype)	Ct(<i>ccpA</i>)	Ct(<i>acoR</i>)	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
LSL(<i>acoR</i>)	27.63	24.14	-3.49		
LSL01(<i>2acoR</i>)	28.26	23.69	-4.57	-1.08	2.11
LSL02(<i>acoRc</i>)	27.79	18.31	-9.48	-5.99	63.56
LSL03(<i>acoRa</i>)	28.66	16.93	-11.73	-8.24	302.33

用补充 0.8mmol/L MnCl₂ · 4H₂O 的 LB 培养基分别培养 LSL10 ~ 13、LSL ~ 03/pHPS 和 LSL ~ 03/pUBS 系列菌株,收集 24h 菌龄细胞,测定 D-海因酶活性。结果显示(图 5),在 P_{acoA}-*hyd* 基因为单拷贝的 LSL10 ~ 13 菌株中,*acoR* 基因表达水平增加到 60 倍,对全细胞的 D-海因酶活性没有影响;当增加到 300 倍时,D-海因酶活性大幅度降低。在 P_{acoA}-*hyd* 基因为低拷贝的 LSL ~ 03/pHPS 菌株中,*acoR* 基因表达水平增加一倍,D-海因酶活性最高,达到 1 230 U/gDCW。在 P_{acoA}-*hyd* 基因约 50 个拷贝的 LSL ~ 03/pUBS 菌株中,*acoR* 基因表达水平增加 60 倍,D-海因酶活性最高,达到 1 470 U/gDCW。结果表明,AcoR 蛋白的胞内水平确实与 P_{acoA}-*hyd* 基因拷贝数之间存在着比例关系。当二者的比例关系合适时,P_{acoA}-*hyd* 基因的表达能够被充分激活。

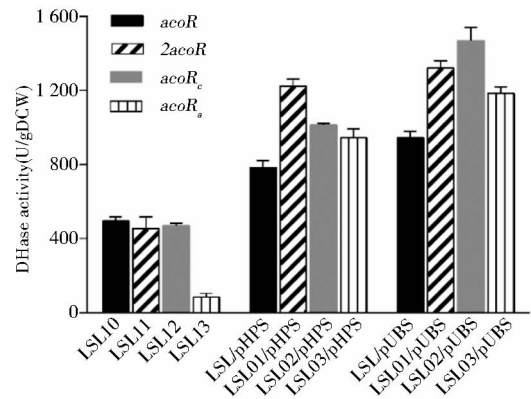


图 5 胞内 AcoR 蛋白水平与不同拷贝数 P_{acoA}-*hyd* 基因表达水平的关系

Fig.5 The relationship between the level of intracellular AcoR and the expression level of different copy number of P_{acoA}-*hyd*

2.4 D-氨甲酰水解酶基因在 *Bacillus subtilis* 中的表达

从质粒 pHG-cdh 上扩增来自的 *Agrobacterium* sp. KNK712 菌株 D-氨甲酰水解酶基因 *adc*,分别与启动子 P_{edd}、P_{spoVG}、P_{lytR}^[26] 和 P_{AE} 拼接,并整合到 *B. subtilis* 168N 染色体上的 *pel* 基因位点,构建重组菌 LN01、LN02、LN03 和 LN04。qRT-PCR 分析结果显示(表 4),*adc* 基因 mRNA 的胞内相对水平为:LN04 > LN02 > LN01 > LN03,其中 LN04 菌株的 P_{AE}-*adc* 基因表达水平是 LN01 菌株 P_{edd}-*adc* 基因表达水平的 60.55 倍。

用补充 0.8mmol/L MnCl₂ · 4H₂O 的 LB 培养基分别培养菌株 LN01、LN02、LN03 和 LN04,收集不同菌龄的细胞,测定 D-氨甲酰水解酶活性。结果显示(图 6),LN04 菌株的 D-氨甲酰水解酶活性最高,17h 菌龄细胞的活性约为 8.0U/gDCW;LN02 菌株次之,14h 菌龄的酶活性约为 6.5U/gDCW;LN01 和 LN03 菌株的酶活性分别低于 0.4U/gDCW 和 0.8U/gDCW。细胞的 D-氨甲酰水解酶活性与 P_{AE}-*adc* 基因的表达水平正相关,采用 P_{AE} 启动子表达 *adc* 基因能够获得相对最高的 D-氨甲酰水解酶活性。

2.5 双酶共表达及培养基组分对催化活性的影响

以 pUB110 为载体,将 P_{acoA}-*hyd* 和 P_{AE}-*adc* 基因融合后与载体酶切连接,转化 LSL02 感受态细胞,用博来霉素抗性筛选出 LSL02/pUBSC 菌株,重组质粒 pUBSC 为 D-海因酶和 D-氨甲酰水解酶基因共表达质粒(图 7)。

为考察不同培养基组分对全细胞催化活性的影响,以 SPM 培养基为对照,替换其中部分有机氮源,或者加入碳源,测定 LSL02/pUBSC 菌株作为全细胞催化剂的催化活性。结果显示(图 8),当使用完全迟效的 2% 烘焙豆粉与 0.5% 酵母粉组合作为氮源的 SPM 培

表 4 不同启动子表达 *adc* 基因的 qRT-PCR 转录分析
Table 4 The transcription analysis of *adc* using qRT-PCR

strains(genotype)	Ct(<i>ccpA</i>)	Ct(<i>adc</i>)	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
LN01(<i>P_{cdd}-adc</i>)	28.41	25.41	-3.00		
LN02(<i>P_{spoVG}-adc</i>)	28.42	22.83	-5.59	-2.59	6.02
LN03(<i>P_{lytR}-adc</i>)	27.44	28.42	-1.94	1.06	0.48
LN04(<i>P_{AE}-adc</i>)	29.05	20.13	-8.92	-5.92	60.55

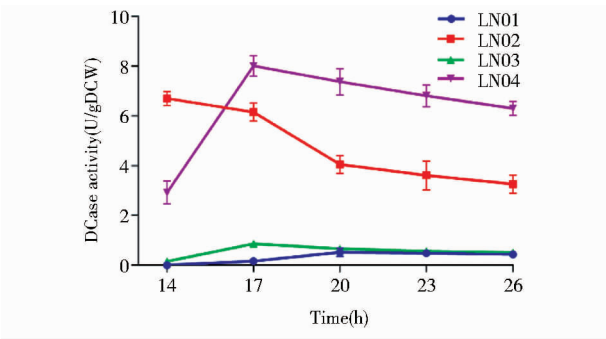


图 6 不同重组菌株 D-氨甲酰水解酶活性比较
Fig. 6 The comparison of D-carbamoylase activity of different recombinant strains. LN01, LN02, LN03 and LN04 refer to the strain using promoter *P_{cdd}*, *P_{spoVG}*, *P_{lytR}* and *P_{AE}* respectively

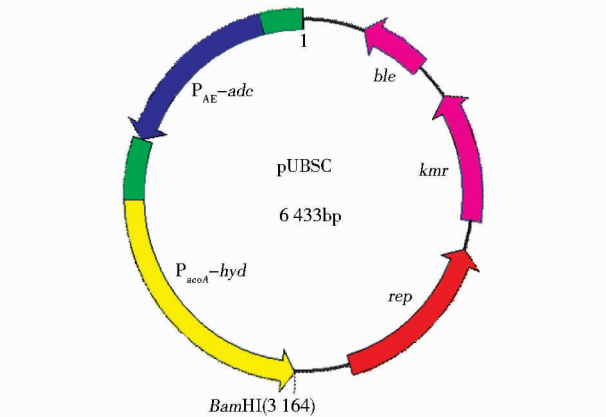


图 7 双酶共表达质粒 pUBSC 的结构示意图
Fig. 7 The schematic of recombinant plasmid pUBSC

培养基,全细胞催化活性最高,22h 菌龄的细胞,催化活性达到 64.6U/gDCW。而用 0.5% 酵母提取物替换其中酵母粉,全细胞催化活性在 24h 最高,为 44.0U/gDCW;用 2% 蛋白胨替换烘焙豆粉,全细胞催化活性在 20h 最高,为 22.0U/gDCW。显然,迟效有机氮源有利于获得较高的催化活性,速效有机氮源降低细胞的催化活性。不论是属于 PTS 糖的葡萄糖,还是属于非 PTS 糖的甘

油,都对细胞的催化活性产生严重的不利影响。

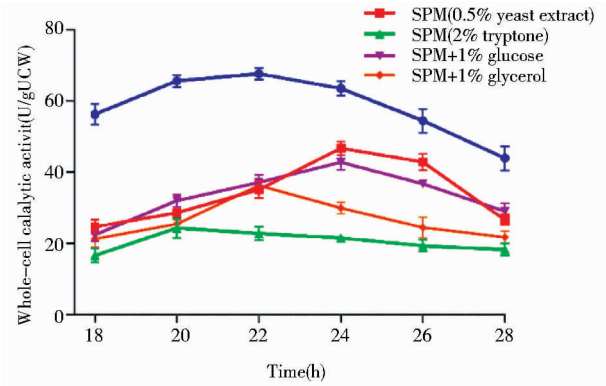


图 8 培养基组分对全细胞催化活性的影响
Fig. 8 The effects of components in medium on whole-cell catalytic activity. The SPM medium served as a control. The yeast powder and soy powder were replaced by yeast extract and tryptone, respectively, and glucose/glycerol was added into SPM medium

2.6 菌株 LSL02/pUBSC 的催化特性

用 SPM 培养基培养 LSL02/pUBSC 菌株,收集 22h 菌龄的细胞作为催化剂,重悬于同体积的反应液中,D, L-HPH 初始浓度为 3.0g/L,反应温度分别为 35℃、40℃、45℃和 50℃。结果表明(图 9),反应温度低于 40℃,反应速率降低;反应温度在 40℃~45℃之间,反

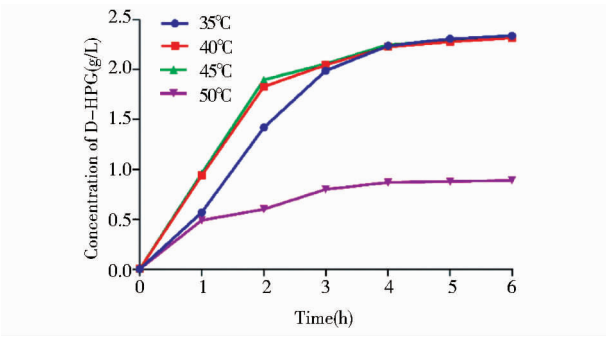


图 9 D-HPG 浓度随反应时间变化
Fig. 9 Time profiles of D-HPG concentrations

应速率相对较高,且无差别;反应温度达到 50℃,反应速率大幅度下降。因此,LSL02/pUBSC 菌株作为全细胞催化剂的最适温度在 40℃ ~45℃ 之间。

40℃ 反应过程的 HPLC 图谱显示(图 10),反应过

程中有 D-CpHPG 积累,表明 D-海因酶的催化速率高于 D-氨甲酰水解酶,反应 6h 后底物被 100% 转化且无中间物积累, D-HPG 浓度达到 2.34g/L,实际收率接近 90%。

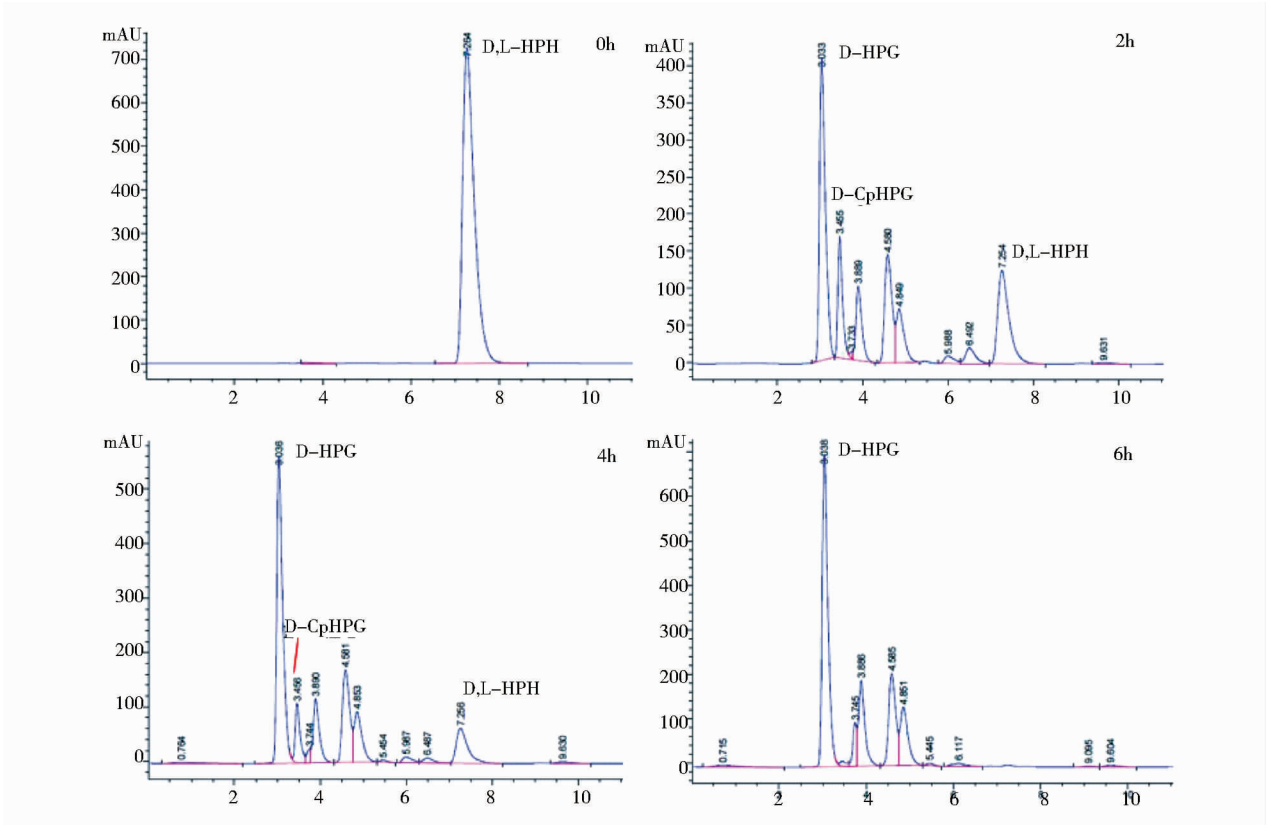


图 10 40℃不同反应时间反应液液相色谱图

Fig. 10 Chromatograms of solution at different reaction time at 40℃

将 D,L-HPH 的初始浓度分别提高为 10g/L,15g/L 和 20g/L,以菌体和底物 2: 1 的比例(收集 8ml 细胞,浓缩在 4ml 的离心管中),在标准条件下进行反应,间隔 2h 取样测定反应体系中 D-HPG 浓度的变化,观察底物消耗和中间物的积累情况。结果表明(图 11),反应 12h 后 D-HPG 的浓度分别为 7.65g/L、11.05g/L 和 14.32g/L;收率分别达到 88.0%、84.7% 和 82.4%。通过观察反应过程色谱图可知,该催化剂用量下,底物浓度低于 15g/L,可以实现 100% 转化,但 15g/L 时有少量的中间物积累;当底物浓度为 20g/L 时,约 95% 底物可以被转化,中间物有少量残留,且延长反应时间,各组分浓度无变化。可以看出,以该菌做全细胞催化剂,使用 12 h 后催化活性出现衰竭。

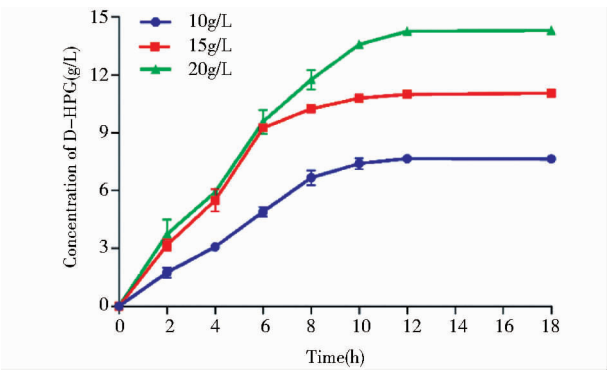


图 11 不同 D, L-HPH 浓度下 LSL02/pUBSC 全细胞催化反应过程

Fig. 11 The Catalytic reaction process of LSL02/pUBSC strain at different concentration of D, L-HPH

3 讨论

在 *Bacillus subtilis* 中,利用羧基丁酮诱导表达启动子 P_{acoA} 表达来自 *Bacillus stearothermophilus* SD-1 的 D-海因酶,并成功的构建低拷贝表达质粒 pHPS 和高拷贝表达 pUBS。表明启动子 P_{acoA} 是可靠的,使用方便的诱导表达元件。D-海因酶的晶体结构研究显示其活性中心含有两个配位的 Zn^{2+} ,而在含 Mn^{2+} 的缓冲液中其活性稳定,本研究证实了培养基中添加 Mn^{2+} 比 Zn^{2+} 对 D-海因酶活性的激活作用更强烈。 Mn^{2+} 在活性中心的占位空间要大于 Zn^{2+} ,可能更有利于 D-5'-取代基团较大的底物,如 D-HPH 与 D-海因酶的活性中心结合。

RNA 聚合酶和 σ^L 识别的启动子形成闭合的转录复合物,AcoR 蛋白与 P_{acoA} 上游结合域结合形成高度有序的寡聚体,通过 ATP 水解提供能量来改变复合物构象,其构象转变为活化状态后与 σ^L 相互作用,从而激活转录^[27-28]。单拷贝 *acoR* 基因表达所形成的胞内 AcoR 蛋白水平,或许只能充分激活低拷贝的 P_{acoA} 启动子。如果细胞内存在约 50 个拷贝的质粒 pUBS,过表达 *acoR* 基因,提高胞内的 AcoR 蛋白水平,才能充分激活所有 P_{acoA} 启动子,得到较高活性的 D-海因酶。反之,如果 *acoR* 基因过表达导致 AcoR 蛋白胞内水平较高,但 P_{acoA} 启动子拷贝数较低时,胞内过量的 AcoR 蛋白可能会改变与 P_{acoA} 启动子上游元件的结合方式或影响其构象转变,而不利 RNA 聚合酶与 P_{acoA} 启动子的结合,导致 D-海因酶活性降低。因此,胞内 AcoR 蛋白水平与 P_{acoA} 启动子拷贝数之间存在合适的比例关系。在之前的研究中也貌似体现了这种比例关系的存在,Silbersack 等^[23]利用该系统表达 *amyE* 基因,将 *acoR* 分别在染色体上整合表达和多拷贝质粒表达,使淀粉水解酶活性分别提高了 2 倍和 3 倍。而在 Sophia Zobel 的研究^[29]中当额外增加一个 *acoR* 和 *sigL* 拷贝,导致细胞恩镰孢菌素的产量几乎消失。

P_{AE} 是组成型表达的强启动子,转录分析数据也证实了 P_{AE} -*adc* 基因被高水平转录。另外,D-海因酶与 D-氨甲酰水解酶的比活性也相差不大。但是在单拷贝 P_{acoA} -*hyd* 基因被诱导表达的 LSL10 菌株中,细胞的 D-海因酶活性达到 500U/gDRW。而单拷贝的 P_{AE} -*adc* 基因在 LN4 菌株中组成型表达,细胞的 D-氨甲酰水解酶活性仅为 8.0U/gDCW,二者相差两个数量级。虽然培养基中烘焙豆粉和酵母粉等迟效氮源有利于提高细胞的 D-氨甲酰水解酶活性,但是对酶活性的实际提高幅

度有限。另外 D-氨甲酰水解酶热稳定性差,容易被氧化失活。但是全细胞催化活性均在 40℃ 密闭的反应容器中检测,不应该对酶活性有重大影响。为了提高 D-氨甲酰水解酶的热稳定性或比活性,本研究在 D-氨甲酰水解酶中分别引入了 Cys²⁷⁹→Ser²⁷⁹ 和 Ile²⁸⁶→Ala²⁸⁶ 点突变^[30-31],但是这两个点突变均为负效应(数据未显示)。D-氨甲酰水解酶活性低的原因有待于进一步研究。能否通过调节启动子强度平衡两酶的表达水平,优化两者的表达比例以实现催化效率的最大化,此项工作可以进一步作为后续的研究内容。

菌株 *B. subtilis* LSL02/pUBSC 具有 D-海因酶和 D-氨甲酰水解酶双酶活性,作为双酶法生产 D-HPG 的全细胞催化剂具有如下优势:采用普通发酵原料,诱导剂羧基丁酮价格低廉,发酵时间少于 24h,生物量达到 10⁹ cell/ml,反应温度低于 45℃,底物的转化率可以达到 100%,没有中间物 D-CpHPG 积累,反应时间可持续 12h,产物 D-HPG 的收率不低于 80%。如果解决了 D-氨甲酰水解酶的活性偏低的问题,重组 *B. subtilis* 将能够完全满足 D-HPG 的工业生产需要。

参考文献

- [1] Nandanwar H S, Prajapati R, Hoondal G S. (D)-p-Hydroxyphenylglycine production by thermostable D-hydantoinase from *Brevibacillus parabrevis*-PHG1. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2013, 31(1): 22-32.
- [2] Runser S, Chinski N, Ohleyer E. D-p-Hydroxyphenylglycine production from dl-5-p-hydroxyphenylhydantoin by *Agrobacterium* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 33(4): 382-388.
- [3] Clemente-Jiménez JM, Martínez-Rodríguez S, Rodríguez-Vico F, et al. Optically pure alpha-amino acids production by the "Hydantoinase Process". *Recent Patents on Biotechnology*, 2008, 2(1): 35-46.
- [4] Drauz K, Gröger H, May O. Enzyme catalysis in organic synthesis. *Russian Chemical Reviews*, 2012, 50(8): 718.
- [5] 梅艳珍, 何冰芳, 欧阳平凯. 海因酶与氨甲酰水解酶产生菌的鉴定及分布. *微生物学通报*, 2007, 34(6): 1104-1108.
Mei Y Z, He B F, Ouyang P K. Identification and distribution of hydantoinase- and carbamoylase-producing bacteria. *Microbiology China*, 2007, 34(6): 1104-1108.
- [6] Cheon Y H, Park H S, Kim J H, et al. Manipulation of the active site loops of d-hydantoinase, a (β/α)8-barrel protein, for modulation of the substrate specificity. *Biochemistry*, 2004, 43(23): 7413-7420.

- [7] Cheon Y H, Park H S, Lee S C, et al. Structure-based mutational analysis of the active site residues of d -hydantoinase. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2003, 26 (3-6): 217-222.
- [8] Cheon Y H, Kim H S, Han K H, et al. Crystal structure of D-hydantoinase from *Bacillus stearothermophilus*; Insight into the stereochemistry of enantioselectivity. *Biochemistry*, 2002, 41 (30): 9410-9417.
- [9] Lee S G, Lee D C, Kim H S. Purification and characterization of thermostable D-hydantoinase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* SD-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997, 62(2): 251-266.
- [10] Martínez-Rodríguez S, Martínez-Gómez A I, Rodríguez-Vico F. Carbamoylases: Characteristics and applications in biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 441-458.
- [11] Nanba H, Ikenaka Y, Yamada Y, et al. Isolation of *Agrobacterium* sp. strain KNK712 that produces N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase, cloning of the gene for this enzyme, and properties of the enzyme. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998, 62(5): 875-881.
- [12] Park J H, Kim G J, Kim H S. Production of D-amino acid using whole cells of recombinant *Escherichia coli* with separately and coexpressed D-hydantoinase and N-carbamoylase. *Biotechnology Progress*, 2000, 16(4): 564-570.
- [13] Zhang J, Cai Z. Efficient and cost-effective production of D-p-hydroxyphenylglycine by whole-cell bioconversion. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014, 19(1): 76-82.
- [14] Hu X, Lin B. Efficient production of D-HPG with an immobilized transgenic strain LY13-05. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2015, 29(5): 1-8.
- [15] Jiang S, Li C, Zhang W, et al. Directed evolution and structural analysis of N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase provide insights into recombinant protein solubility in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 2007, 402(3): 429-437.
- [16] Sylđatk C, May O, Altenbuchner J, et al. Microbial hydantoinases-industrial enzymes from the origin of life. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51(3): 293-309.
- [17] 王亚盟,班睿,刘露,等. 异源 D-海因酶和 N-氨甲酰水解酶共表达重组枯草芽孢杆菌的构建. *微生物学报*, 2017, 57(1):54-65.
- Wang Y M, Ban R, Liu L, et al. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* by co-expression of heterologous D-hydantoinase and N-carbamoylase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(1): 54-65.
- [18] Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(2): e19.
- [19] Spizizen J. Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1958, 44(10):1072-1078.
- [20] Liu S, Endo K, Ara K. Introduction of marker-free deletions in *Bacillus subtilis* using the *araR* repressor and the *ara* promoter. *Microbiology*, 2008, 154(9): 2562-2570.
- [21] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): 2002-2007.
- [22] Wu S C, Wong S L. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 1999, 72(3): 185-195.
- [23] Silbersack J, Jürgen B, Hecker M, et al. An acetoin-regulated expression system of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(4): 895-903.
- [24] Kabisch J, Thürmer A, Hübel T, et al. Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host. *Journal of Biotechnology*, 2013, 163(2): 97-104.
- [25] Zhu H, Yang S M, Yuan Z M, et al. Metabolic and genetic factors affecting the productivity of pyrimidine nucleoside in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 1-12.
- [26] Yang S, Du G, Jian C, et al. Characterization and application of endogenous phase-dependent promoters in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(10): 4151-4161.
- [27] Ali N O, Bignon J, Rapoport G, et al. Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(8): 2497-2504.
- [28] Rappas M, Schumacher J, Beuron F. Structural insights into the activity of enhancer-binding proteins. *Science*, 2005, 307(5717): 1972-1975.
- [29] Zobel S, Kumpfmüller J, Schweder T, et al. *Bacillus subtilis*, as heterologous host for the secretory production of the non-ribosomal cyclodepsipeptide enniatin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 681-691.
- [30] Buson A, Negro A, Grassato L. Identification, sequencing and mutagenesis of the gene for a D-carbamoylase from *Agrobacterium radiobacter*. *Fems Microbiology Letters*, 2010, 145(1): 55-62.
- [31] Nakai T, Hasegawa T, Yamashita E, et al. Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure*, 2000, 8(7): 729-737.

Construction of Recombinant *Bacillus subtilis* as Catalyst for Preparing D- p-Hydroxyphenylglycine

LI Fa-bin LIU Lu DU Yan Ban Rui

(1 School of Chemical Engineering and Technology, Key Laboratory of Systems Biotechnology of Ministry of Education, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Abstract Objective: To construct the recombinant *Bacillus subtilis* with D-hydantoinase (DHase, *hyd* gene) and D-carbamoylase (DCase, *adc* gene) activity as catalyst to produce D-p-hydroxyphenylglycine (D-HPG) by hydantoinase process. Methods: The *hyd* gene expression plasmids were constructed. The effects of divalent metal ions in medium on the DHase activity was investigated. The *acoR* gene was over-expressed to investigate the correlation between the activator protein AcoR and P_{acoA} -*hyd* gene expression. The optimal promoter used to express *adc* gene was screened from the P_{AE} , P_{spoVG} , P_{cdd} and P_{lytR} . The *hyd* and *adc* gene co-expression plasmid was constructed and its catalytic properties was characterized. Results: The *hyd* gene expression plasmid pHPS and pUBS were successfully constructed. Mn^{2+} has a strong activation effect on DHase and the activity of the 168N/pUBS reached 956U/gDCW when 0.8mmol/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ was added to the medium. Adding a copy of the P_{cdd} -*acoR* gene, DHase activity of the LSL02/pUBS reached 1 470 U/gDCW. The LN04 strain integrated with the P_{AE} -*adc* had the highest DCase activity. The co-expression plasmid pUBSC was constructed, and under the optimum conditions of pH 8.0 and 40°C, with initial substrate concentration of 20g/L, the catalytic activity of LSL02/pUBSC could last for 12h to generate 14.32g/L of D-HPG with the conversion rate of 95%, yield of 82.4%. Conclusion: The recombinant strain with higher dual enzyme activity can be obtained when heterologous *hyd* and *adc* were expressed in *Bacillus subtilis* and it is technically feasible and has the application prospect for preparing D-HPG by hydantoinase process.

Key words *Bacillus subtilis* Heterologous expression D-hydantoinase D-carbamoylase D-p-Hydroxyphenylglycine