

研究报告

基于己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶共表达的辅酶 NADPH 高效再生

郑雅楠 陈少云* 刘文洪 郭莹

(浙江中医药大学生命科学院 浙江 杭州 310053)

摘要:【目的】构建己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的大肠杆菌共表达体系,以葡萄糖为底物实现辅酶 NADPH 的高效再生。【方法】通过分子生物学方法,克隆己糖激酶 *HKgs*、*HKpp* 基因,并于 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中表达,再将己糖激酶 *HKgs*、*HKpp* 分别与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 *GpdPP* 共表达,实现 NADPH 的原位再生。比较两个共表达工程菌的辅酶再生效果,并针对催化活力较高的工程菌 BL21(*HKgs*+*GpdPP*) 进行表达条件优化。【结果】NADPH 再生活力达到 856 U/L。该辅酶再生体系与醇脱氢酶 *AdhR* 联合催化,使不对称还原 4-氯乙酰乙酸乙酯的催化活力提高至原始值的 2.5 倍。【结论】通过己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在大肠杆菌中的共表达,构建了一个新的 NADPH 高效再生体系,并用于醇脱氢酶催化的不对称还原反应。

关键词: 共表达, 己糖激酶, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, NADPH, 高效再生

Efficient NADPH regeneration based on co-expression of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase

ZHENG Ya-Nan CHEN Shao-Yun* LIU Wen-Hong GUO Ying

(College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310053, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to construct a co-expression system of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli* to regenerate NADPH with glucose as substrate efficiently. [Methods] Hexokinase genes *HKgs* and *HKpp* were cloned and expressed in *E. coli* BL21(DE3), and then the co-expression system of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase was established to achieve efficient in-situ regeneration of NADPH. Among the two co-expression systems, BL21(*HKgs*+*GpdPP*) was better, so the expression condition of BL21(*HKgs*+*GpdPP*) was optimized. [Results] The catalytic activity of NADPH regeneration reached 856 U/L. The coupling catalysis was performed with this co-enzyme regeneration system and alcohol dehydrogenase *AdhR*, the catalytic activity of asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate was enhanced up to 2.5 times. [Conclusion] Through co-expression system of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*, new effective NADPH regeneration system

Foundation item: Education Department Scientific Research Projects of Zhejiang Province (No. Y201431455)

*Corresponding author: Tel: 86-571-86613713; E-mail: csy003@163.com

Received: August 06, 2016; Accepted: October 12, 2016; Published online (www.cnki.net): October 13, 2016
基金项目: 浙江省教育厅科研项目(No. Y201431455)

*通讯作者: Tel: 86-571-86613713; E-mail: csy003@163.com

收稿日期: 2016-08-06; 接受日期: 2016-10-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-10-13

was constructed, and success for a symmetric reduction by alcohol dehydrogenase.

Keywords: Co-expression, Hexokinase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, Efficient regeneration

氧化还原酶催化的不对称还原反应常被用来制备手性化合物,例如手性醇、羧基酸等,广泛应用于精细化工、制药、食品等领域^[1-2]。大多数氧化还原酶催化的不对称还原反应都需要还原型辅酶,而这些辅酶往往价格昂贵,一定程度上限制了氧化还原酶的应用^[3]。目前,解决辅酶问题的方法是直接添加辅酶或辅酶原位再生。与直接添加辅酶相比,辅酶原位再生可以大大降低反应的成本,优势明显,是目前解决辅酶问题的主要方法^[4]。被用于辅酶原位再生的酶主要有醇脱氢酶^[5]、葡萄糖脱氢酶^[6]、甲酸脱氢酶^[7]、谷氨酸脱氢酶^[8]、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶^[9]等。在前期研究中,我们发现源于毕赤酵母 GS115 (*Pichia pastoris* GS115)的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 GpdPP 的 NADPH 再生活力很高 (125 U/mg),然而其催化的底物 6-磷酸葡萄糖价格昂贵,反应的成本也很高^[10]。因此,如果将葡萄糖的磷酸化反应与其偶联,有望构建一个 NADPH 高效再生新方法。己糖激酶是生物糖酵解代谢途径的第一个酶,催化葡萄糖的磷酸化,反应产物为 6-磷酸葡萄糖^[11-12]。本研究通过己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的共表达,构建以葡萄糖和 ATP 为底物的 NADPH 再生体系,如图 1A 所示,并对共表达条件进行优化,实现 NADPH 的高效原位再生。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

质粒 pCDFDuet-1、重组质粒 pET30-GpdPP、毕赤酵母 GS115 的 cDNA (cDNA_GS115)、毕赤酵母 GS115、大肠杆菌 BL21(DE3) (*Escherichia coli*

BL21(DE3))、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、工程菌 BL21(pET30-AdhR)均由实验室保存。

限制性内切酶(*EcoR* I, *Xho* I)、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶溶液(PrimeSTAR[®] MAX DNA Polymerase), 宝生物(大连)生物工程有限公司 (TaKaRa); AxyPrep 质粒 DNA 小量制备试剂盒、AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, 杭州 Axygen Biotechnology 公司; 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG)、NADP、ATP、抗生素购自北京鼎国生物技术有限责任公司; PCR 引物合成和基因测序委托美国 Invitrogen 公司上海技术服务部; 其余试剂和药品均为进口或国产分析纯。

超净工作台, 苏净集团安泰公司; 振荡培养箱, 金坛市富华仪器有限公司; 恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; 酶标仪, 美国 Thermo Scientific 公司; 气相色谱仪, 浙江福利分析仪器有限公司; 超声细胞破碎仪, 宁波新芝科技研究所; 高压灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 凝胶成像仪, 上海培清科技有限公司; 高速冷冻离心机, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 电泳仪、PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 调 pH 至 7.0, 配固体培养基时, 再添加琼脂粉至 20.0。

大肠杆菌 BL21(DE3)、DH5 α 培养采用 LB 培养基, 培养温度为 37 °C, 振荡转速为 200 r/min。大肠杆菌重组子筛选时, 根据质粒所带的抗性基因, 在 LB 培养基中添加相应的抗生素(卡那霉素

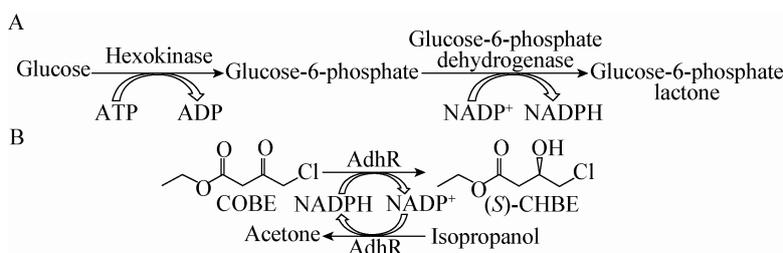


图 1 本研究的催化反应

Figure 1 Catalytic reaction in this research

50 mg/L、链霉素 50 mg/L)。

1.3 *HKpp* 和 *HKgs* 基因的克隆

PCR 引物设计如下:

F_ *HKpp* :5'-CGGAATTCGATGGTTCCTGTTT
TGACC-3' ;

R_ *HKpp* :5'-CCGCTCGAGTCATTCTGGTGTG
AAGAC-3' ;

F_ *HKgs* :5'-CGGAATTCGATGCCTATTGCTA
AACCAG-3' ;

R_ *HKgs* :5'-CCGCTCGAGCTAGGCTTTTTTG
TAAGC-3'。

F_ *HKpp*、F_ *HKgs* 均带有 *EcoR* I 酶切位点,
R_ *HKpp*、R_ *HKgs* 均带有 *Xho* I 酶切位点。

以 cDNA_ *GS115* 为模板,在 50 μ L 体系中分别
进行 PCR 扩增基因片段 *HKpp* 和 *HKgs*。PCR 体系:
无菌去离子水 21 μ L, DNA 聚合酶溶液 25 μ L,
10 μ mol/L 上下游引物各 1.5 μ L, 模板 1 μ L。反应
条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C
10 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min。经过电泳, 切胶回
收目的条带, 得目的基因 *HKpp* 和 *HKgs* 样品。

1.4 表达载体 pCDFDuet-*HKpp* 和 pCDFDuet-*HKgs* 的构建

将获得的的目的基因 *HKpp* 和 *HKgs* 样品和质粒
pCDFDuet-1, 分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切。分别
电泳并切胶回收目标条带, 再将两个基因酶切产物
分别与质粒酶切产物进行连接, 连接产物分别转化
到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 验证重组
子, 再提质粒送样测序, 基因测序确认成功, 即得
重组质粒 pCDFDuet-*HKpp* 和 pCDFDuet-*HKgs*。

感受态细胞的制备参照 TaKaRa 公司试剂盒说
明书。

质粒 DNA 提取、DNA 凝胶回收参照 Axygen
Biotechnology 公司试剂盒说明书。

1.5 工程菌的构建

用重组质粒 pCDFDuet-*HKpp* 与重组质粒
pET30-*GpdPP* 共转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细
胞, 挑重组子至 LB 培养基活化培养。以重组子菌
液为模板, 用引物 F_ *HKpp*/R_ *HKpp* 扩增基因
HKpp, 用引物 F_ *GpdPP*/R_ *GpdPP* 扩增基因 *GpdPP*,

再跑核酸电泳观察扩增情况, 两个基因都扩增成功
的重组子, 可作为工程菌 BL21(*HKpp*+*GpdPP*)。

用重组质粒 pCDFDuet-*HKgs* 与重组质粒
pET30-*GpdPP* 共转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细
胞, 挑重组子至 LB 培养基活化培养。以重组子菌
液为模板, 用引物 F_ *HKgs*/R_ *HKgs* 扩增基因 *HKgs*,
用引物 F_ *GpdPP*/R_ *GpdPP* 扩增基因 *GpdPP*, 再进
行核酸电泳观察扩增情况, 两个基因都扩增成功
的重组子, 可作为工程菌 BL21(*HKgs*+*GpdPP*)。

扩增基因 *GpdPP* 的 PCR 引物设计如下:

F_ *GpdPP* :5'-GAAGATCTGATGACCGATACGA
AAGCCGTAG-3' ;

R_ *GpdPP* :5'-CCCGATATCTTACATCTTGTGCA
GCAC-3'。

1.6 工程菌的诱导

重组细胞粗酶液制备: 工程菌接种于液体 LB
培养基中(按质粒所含抗性基因添加抗生素, 卡那霉
素 50 mg/L、链霉素 50 mg/L), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培
养至 OD_{600} 值为 0.6。加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导,
置于 16 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h。

取培养好的菌液若干, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心
5 min 收集菌体, 弃上清, 再用 100 mmol/L 羟乙基
哌嗪乙硫磺酸缓冲液(HEPES, pH 7.0)重悬菌体(细
胞干重调至 4 g/L), 即得静息细胞悬液。

取静息细胞悬液 2 mL, 冰浴超声, 400 W 功率
超声破碎 20-30 次, 每次超声持续 3 s, 间歇 7 s,
即得粗酶液。

1.7 核酸凝胶电泳

制备 1%核酸胶, 上样, 调节电压至 110 V, 电泳
35 min, 电泳结束后, 置于凝胶成像仪中观察并拍照。

1.8 蛋白质 SDS-PAGE 电泳

取粗酶液 10 000 r/min 离心 2 min, 上清和沉淀
分别加 SDS PAGE Loading Buffer, 99 $^{\circ}$ C 热变性
10 min, 处理成蛋白样品, 备用。电泳时采用 5%
的浓缩胶和 12%的分离胶, 电泳后凝胶用考马斯亮
蓝 R250 染色, 再用脱色液脱色。

1.9 表达条件优化

(1) 诱导温度: 控制温度分别为 16、23、30 $^{\circ}$ C,

IPTG 诱导时机 $OD_{600}=0.6$, IPTG 用量 0.6 mmol/L, 诱导时间 12 h。

(2) 诱导时机: 选择最佳诱导温度 16 °C, 控制 IPTG 诱导时机 OD_{600} 分别为 0.6、0.9、1.2、1.5, IPTG 用量 0.6 mmol/L, 诱导时间 12 h。

(3) 诱导强度: 选择最佳诱导温度 16 °C, 最佳诱导时机 $OD_{600}=1.2$, 控制 IPTG 用量分别为 0.3、0.6、0.9、1.2 mmol/L, 诱导时间 12 h。

(4) 诱导时间: 选择最佳诱导温度 16 °C, 最佳诱导时机 $OD_{600}=1.2$, 最佳诱导强度 0.6 mmol/L, 控制诱导时间为 10、12、16、20 h。

1.10 NADPH 再生能力的测定

在 1 mL 的石英比色皿中加入 100 mmol/L 的羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液 600 μ L, 10 mmol/L NADP 和 100 mmol/L ATP 各 100 μ L, 100 mmol/L 葡萄糖 100 μ L, 粗酶液或纯酶液 100 μ L, 340 nm 吸光值动态扫描, 取 2 min 内的数据, 拟合线性方程, 记录下斜率 S 和 R^2 。 $S \times 10^6 / 6250 = \text{NADPH 再生速率}$ [单位为 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$], 其中 6250 为摩尔消光系数(单位为 $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$)。

酶的催化活力以每 min 生成 1 μmol 产物为 1 U。粗酶液的活力以每 L 发酵液中所得酶的催化活力计, 单位为 U/L。纯酶的活力以每 g 蛋白质的催化活力计, 单位为 U/g。

分析己糖激酶活力时, 将己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶两种粗酶液(或两种纯酶液)按照体积比 1:1 混合, 再测辅酶再生活力(此时己糖激酶为限速酶), 即为己糖激酶活力。

1.11 蛋白质的纯化

(1) 样品制备: 用缓冲液 A (20 mmol/L pH 7.5 磷酸钠缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑) 重悬静息细胞, 置于冰水浴中超声破碎, 12 000 r/min、4 °C 离心 1 min 去除细胞碎片, 取上清, 再用 0.22 μ L 滤膜过滤, 所得滤液即为样品。

(2) 平衡镍柱: 用缓冲液 A 冲洗镍离子亲和层析柱, 流速 1.0 mL/min, 待 UV280 吸光值下降到最低值且稳定后, 可上样。

(3) 上样: 将制得的样品缓慢上柱, 上样量

为 50 mL, 流速为 0.2 mL/min, 再用缓冲液 A 冲洗 10 个柱体积, 至 UV280 吸光值下降到最低值且稳定。

(4) 洗脱: 用缓冲液 B (20 mmol/L pH 7.5 磷酸钠缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑) 洗脱, 待 UV280 吸光值上升时, 开始收集洗脱液, 并在 UV280 吸光值下降到较低值时停止收集。

(5) 脱盐: 用脱盐柱 (HiTrap Desalting, GE Healthcare) 对纯化后的纯酶液进行脱盐。用羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.0) 平衡脱盐柱至基线水平, 上样(上样量 1.5 mL), 上样后采用羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.0) 洗脱, 当 UV280 吸光值开始上升时收集样品, 当电导值开始上升时停止收集。

(6) 电泳验证与浓度检测: 纯化后的纯酶液用蛋白质 SDS-PAGE 进行分析, 若为单一条带, 则表明纯化效果好。浓度测定采用考马斯亮蓝法。以标准蛋白浓度(g/L)为横坐标, 吸光值 A_{595} 为纵坐标, 线性拟合, 可得一条标准曲线 $y=0.4983x$, $R^2=0.999$ (线性范围: $0 \leq x \leq 1.0 \text{ mg/mL}$)。

1.12 辅酶再生体系协助的不对称还原反应

以工程菌 BL21(pET30-AdhR) 诱导表达所得 AdhR 粗酶液作为催化 4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE) 不对称还原的催化剂, 以 BL21(HKgs+GpdPP) 诱导表达所得粗酶液和 AdhR 同时作为辅酶再生的催化剂, 进行多酶协同催化。AdhR 酶(醇脱氢酶)^[10,13] 催化的反应如图 1B 所示。

(1) 反应体系: 体系总体积为 1 mL, BL21(pET30-AdhR) 粗酶液 100 μ L, BL21(HKgs+GpdPP) 粗酶液 100 μ L, 异丙醇 50 μ L, COBE 10 mmol/L, NADP^+ 1 mmol/L, ATP 10 mmol/L, 葡萄糖 20 mmol/L, 羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.0) 补足 1 mL。仅用 AdhR 酶催化时, 用 100 mmol/L pH 7.0 的羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液替代 BL21(HKgs+GpdPP) 粗酶液。

(2) 反应条件: 30 °C、200 r/min。

(3) 分析条件: GC 分析, SE54 Capillary Column 60 m \times 0.54 mm \times 1 μ m; 载气 N_2 ; 柱温 120 °C 5 min, 30 °C/min, 260 °C 5 min; 检测器 280 °C; 进样器

280 °C ; 进样量 1.0 μ L。4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE) 出峰时间 5.84 min , (S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯 [(S)-CHBE]出峰时间 6.24 min。以 100 ppm 的正十八烷(n-Octadecane)为内标, (S)-CHBE 的定量标准曲线为 $y=0.6657x$, $R^2=0.9938$ 。x 为目标化合物浓度(mmol/L), y 为目标峰面积/内标峰面积。(线性范围: $0 \leq x \leq 30$ mmol/L)

2 结果与讨论

2.1 己糖激酶的克隆表达

经过 GenBank 数据库检索,得到两条源于毕赤酵母 GS115 的己糖激酶基因序列: *HKpp*, *HKgs*。

HKpp 基因序列 GenBank 编号为 XM_002490534, 基因大小为 1 425 bp。 *HKgs* 的基因序列 GenBank 编号为 XM_002490652, 基因大小为 1 491 bp。

以 cDNA_GS115 为模板,经过 PCR 扩增,得到相应的基因条带,如图 2 所示。条带大小和理论值一致。

分别将 *HKpp* 和 *HKgs* 基因构建到 pCDFDuet-1 的多克隆位点,得到两个重组表达载体: pCDFDuet-HKpp 和 pCDFDuet-HKgs。再将这两个重组表达载体,分别转化 *E. coli* BL21(DE3),即得到两个工程菌: BL21(pCDFDuet-HKpp) 和 BL21(pCDFDuet-HKgs)。分别对两个工程菌进行 IPTG 诱导表达,表达结果如图 3 和图 4 所示,可见均能较好的进行可溶表达。

分别过镍柱纯化,得到 *HKpp* 和 *HKgs* 的纯酶,

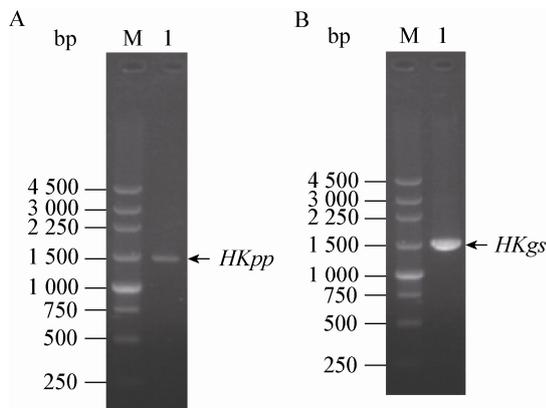


图 2 *HKpp* 基因和 *HKgs* 基因电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of *HKpp* gene and *HKgs* gene
注: A: M: Marker; 1: *HKpp* 基因; B: M: Marker; 1: *HKgs* 基因
Note: A: M: Marker; 1: *HKpp* gene; B: M: Marker; 1: *HKgs* gene.

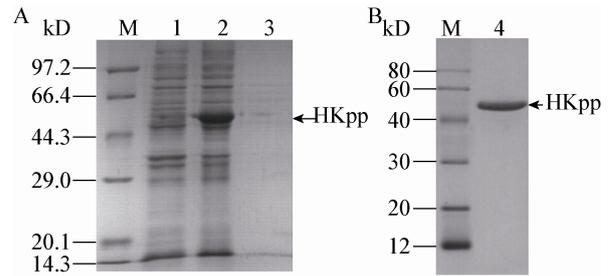


图 3 *HKpp* 酶电泳图

Figure 3 Electrophoretogram of enzyme *HKpp*

注: M: Marker; 1: BL21(pCDFDuet)破胞液; 2: BL21(pCDFDuet-HKpp)上清; 3: BL21(pCDFDuet-HKpp)沉淀; 4: 纯化的 *HKpp* 蛋白。
Note: M: Marker; 1: Extract of BL21(pCDFDuet); 2: Supernatant extract of BL21(pCDFDuet-HKpp); 3: Sediment extract of BL21(pCDFDuet-HKpp); 4: Pure *HKpp* protein.

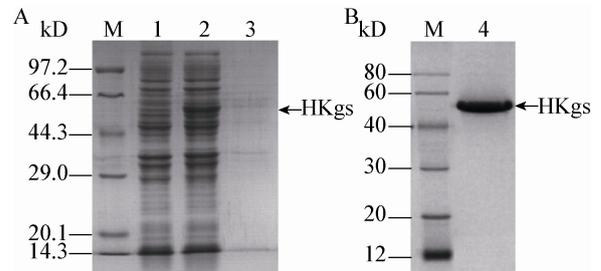


图 4 *HKgs* 酶电泳图

Figure 4 Electrophoretogram of enzyme *HKgs*

注: M: Marker; 1: BL21(pCDFDuet)破胞液; 2: BL21(pCDFDuet-HKgs)上清; 3: BL21(pCDFDuet-HKgs)沉淀; 4: 纯化的 *HKgs* 蛋白。
Note: M: Marker; 1: Extract of BL21(pCDFDuet); 2: Supernatant extract of BL21(pCDFDuet-HKgs); 3: Sediment extract of BL21(pCDFDuet-HKgs); 4: Pure *HKgs* protein.

条带大小分别接近 52 kD 和 54 kD, 与理论值一致。检测比活力, *HKpp* 的比活力为 1 274 U/g, *HKgs* 的比活力为 1 680 U/g。 *HKgs* 的比活力略高于 *HKpp*。

2.2 己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的共表达

利用重组质粒 pCDFDuet-HKpp 和 pET30-GpdPP 共转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,可得共表达工程菌 BL21(*HKpp*+GpdPP)。利用重组质粒 pCDFDuet-HKgs 和 pET30-GpdPP 共转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,可得共表达工程菌 BL21(*HKgs*+GpdPP)。

对工程菌 BL21(*HKpp*+GpdPP)进行诱导表达,表达结果如图 5 所示, *GpdPP* 的表达量高于 *HKpp*。对工程菌 BL21(*HKgs*+GpdPP)进行诱导表达,表达结果如图 6 所示, *GpdPP* 的表达量高于 *HKgs*。比较图 3、4、5 和 6 可知, *HKpp* 和 *HKgs* 单独

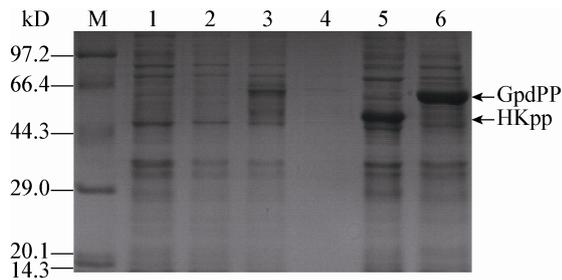


图5 HKpp 和 GpdPP 共表达电泳图

Figure 5 Coexpression electrophoretogram of HKpp and GpdPP

注：1：BL21(pCDFDuet)破碎液；2：BL21(pET30)破碎液；3：BL21(HKpp+GpdPP)上清；4：BL21(HKpp+GpdPP)沉淀；5：BL21(pCDFDuet-HKpp)上清；6：BL21(pET30-GpdPP)上清。

Note: 1: Extract of BL21(pCDFDuet); 2: Extract of BL21(pET30); 3: Supernatant extract of BL21(HKpp+GpdPP); 4: Sediment extract of BL21(HKpp+GpdPP); 5: Supernatant extract of BL21(pCDFDuet-HKpp); 6: Supernatant extract of BL21(pET30-GpdPP).

表达时均可以大量表达，但是双质粒共表达后表达量均显著降低，可能是由于 GpdPP 的表达较强，占用了细胞内的大量表达资源^[14]，从而压制了 HKpp 和 HKgs 的表达，也限制了共表达体系的催化活力。

分别将诱导表达后得到的菌液经过处理后，测定 NADPH 再生催化活力。BL21(HKpp+GpdPP)的活力为 150.3 U/L，BL21(HKgs+GpdPP)的活力为 310.5 U/L。BL21(HKgs+GpdPP)体系的催化活力是 BL21(HKpp+GpdPP)的约 2 倍。

由于不同酶对表达条件的偏好不同，通过表达条件优化或许能够提高共表达体系的催化活力，因

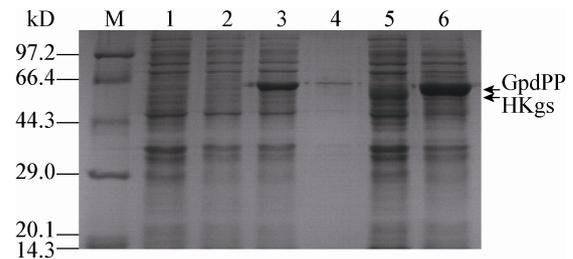


图6 HKgs 和 GpdPP 共表达电泳图

Figure 6 Coexpression electrophoretogram of HKgs and GpdPP

注：1：BL21(pCDFDuet)破碎液；2：BL21(pET30)破碎液；3：BL21(HKgs+GpdPP)上清；4：BL21(HKgs+GpdPP)沉淀；5：BL21(pCDFDuet-HKgs)上清；6：BL21(pET30-GpdPP)上清。

Note: 1: Extract of BL21(pCDFDuet); 2: Extract of BL21(pET30); 3: Supernatant extract of BL21(HKgs+GpdPP); 4: Sediment extract of BL21(HKgs+GpdPP); 5: Supernatant extract of BL21(pCDFDuet-HKgs); 6: Supernatant extract of BL21(pET30-GpdPP).

此接下来对 BL21(HKgs+GpdPP)体系进行表达条件的优化。

2.3 表达条件优化

2.3.1 诱导温度对催化活力的影响：对于诱导温度进行优化，分别考察了 16、23、30 °C 诱导表达的 NADPH 再生活力。结果如图 7A 所示，16 °C 最佳，诱导温度高对于表达不利，可能是由于高温诱导容易出现蛋白质聚集形成包涵体的缘故^[15]。

2.3.2 诱导时机对催化活力的影响：对于诱导时机进行优化，分别在 OD_{600} 为 0.6、0.9、1.2、1.5 时加 IPTG 诱导，再检测 NADPH 再生活力，结果如图

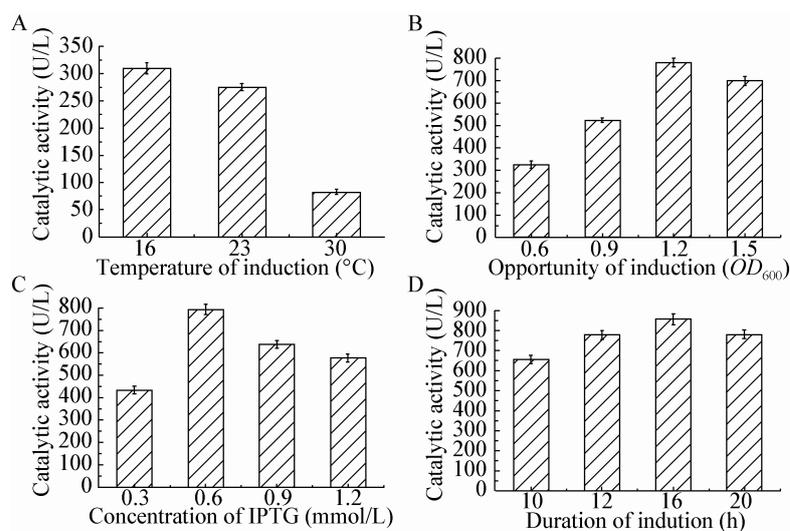


图7 表达条件对酶活性的影响

Figure 7 Influences of expression condition on enzyme activity

7B 所示, OD_{600} 为 1.2 时诱导表达的催化活力最高。 OD_{600} 大于 1.5 时, 诱导活力开始下降, 可能是由于菌体的生长进入稳定期, 有部分菌体细胞开始出现衰退, 质粒丢失的情况也增多^[16]。 OD_{600} 小于 0.9 时, 诱导活力较低可能与菌体生物量较低有关。

2.3.3 诱导强度对催化活力的影响: 对于诱导强度进行优化, 分别考察了 4 种 IPTG 用量: 0.3、0.6、0.9、1.2 mmol/L, 再检测 NADPH 再生活力, 结果如图 7C 所示, 0.6 mmol/L 的 IPTG 用量最佳。过低的 IPTG 用量, 诱导强度不够, 致使诱导活力偏低; 而过高的 IPTG 用量对细胞有一定的毒性, 影响细胞的正常生长代谢, 也会使诱导活力偏低^[16]。

2.3.4 诱导时间对催化活力的影响: 对于诱导时间进行优化, 分别用 IPTG 诱导 10、12、16、20 h, 再检测 NADPH 再生活力, 结果如图 7D 所示, 诱导 16 h 最佳。20 h 以后, 诱导活力开始下降。

经过以上条件优化, BL21(HKgs+GpdPP)共表达体系在诱导温度 16 °C, 诱导时机 $OD_{600}=1.2$, IPTG 用量 0.6 mmol/L 条件下, 诱导 16 h, 表达效果最佳。BL21(HKgs+GpdPP)的催化活力比优化前提高了 2.7 倍, 达到 856 U/L。文献报道的葡萄糖脱氢酶 GdhBS^[10]的比活力为 1 307 U/g, 经检测其在大肠杆菌 BL21(DE3)宿主-pET30a(+)载体中表达的 NADPH 再生催化活力为 736 U/L, 与之相比, 本研究共表达体系的催化活力略有优势。该催化活力表明, 该辅酶再生体系具备了一定的应用价值。

2.4 辅酶再生体系的应用

(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯[(S)-CHBE]是阿托伐他汀的关键中间体, 目前主要的制备方法是用醇脱氢酶催化 4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE)不对称还原得到。前期工作得知^[10], 醇脱氢酶 AdhR 纯酶催化还原 COBE 制备(S)-CHBE 的反应比活力为 1 045 U/g,

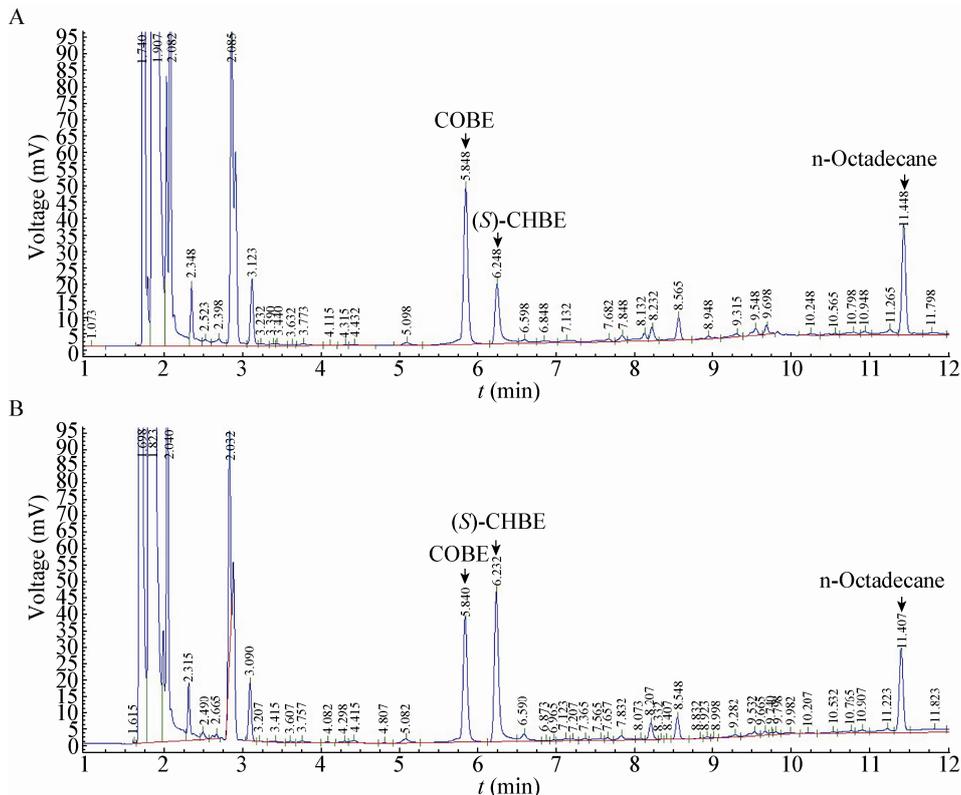


图 8 AdhR 催化不对称还原反应的 GC 检测图谱

Figure 8 GC diagram of asymmetric reduction activity catalyzed by AdhR

注: A: 未添加 BL21(HKgs+GpdPP)粗酶液; B: 添加 BL21(HKgs+GpdPP)粗酶液。

Note: A: No adding BL21(HKgs+GpdPP) enzyme extracts; B: Adding BL21(HKgs+GpdPP) enzyme extracts.

AdhR 纯酶氧化异丙醇的反应比活力为 485 U/g。AdhR 以异丙醇为底物再生 NADPH 的活力, 不能满足其还原 COBE 的需求。引入新的辅酶再生体系有利于提高反应效率。经检测, BL21(pET30-AdhR) 工程菌表达的粗酶液, 以异丙醇作为辅酶再生底物时, 催化 COBE 不对称还原的活力为 206 U/L。将 BL21(pET30-AdhR) 工程菌表达的粗酶液和 BL21(HKgs+GpdPP) 工程菌共表达的粗酶液同时添加到反应体系中, 再以异丙醇、葡萄糖、ATP 同时作为辅酶再生底物, 检测可得, 催化 COBE 不对称还原的活力达到 523 U/L, 催化活力较原始值提高至 2.5 倍。两次反应所得产物的 GC 分析图谱, 如图 8 所示。由此可见, 由 HKgs 和 GpdPP 共表达构建的辅酶再生体系具有一定的应用价值。

3 结论

本研究克隆表达了 2 个己糖激酶 HKgs 和 HKpp, 并分别与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 GpdPP 共表达, 构建了 2 个共表达工程菌 BL21(HKgs+GpdPP) 与 BL21(HKpp+GpdPP)。经过比较, BL21(HKgs+GpdPP) 的 NADPH 再生活力较高。经过进一步对 BL21(HKgs+GpdPP) 的表达条件优化, 在诱导温度为 16 °C, 诱导时机 OD_{600} 为 1.2, IPTG 用量 0.6 mmol/L 条件下, 诱导 16 h, 表达效果最佳, NADPH 再生活力达到 856 U/L。该辅酶再生体系与醇脱氢酶 AdhR 联合催化, 使不对称还原 4-氯乙酰乙酸乙酯的催化活力提高至原始值的 2.5 倍。本研究构建了一种 NADPH 高效原位再生新方法。

参考文献

- [1] Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, 20(5): 513-557
- [2] Knudsen JD, Hägglöf C, Weber N, et al. Increased availability of NADH in metabolically engineered baker's yeast improves transaminase-oxidoreductase coupled asymmetric whole-cell bioconversion[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 37
- [3] Jung J, Park S, Kim HK. Synthesis of a chiral alcohol using a rationally designed *Saccharomyces cerevisiae* reductase and a NADH cofactor regeneration system[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 84: 15-21
- [4] Hummel W, Gröger H. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 191: 22-31
- [5] Siedler S, Lindner SN, Bringer S, et al. Reductive whole-cell biotransformation with *Corynebacterium glutamicum*: improvement of NADPH generation from glucose by a cyclized pentose phosphate pathway using *pfkA* and *gapA* deletion mutants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(1): 143-152
- [6] Kaswurm V, Van Hecke W, Kulbe KD, et al. Guidelines for the application of NAD(P)H regenerating glucose dehydrogenase in synthetic processes[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2013, 355(9): 1709-1714
- [7] Zhang L, Xu YY, Gao J, et al. Introduction of the exogenous NADH coenzyme regeneration system and its influence on intracellular metabolic flux of *Paenibacillus polymyxa*[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 201: 319-328
- [8] El-Zahab B, Donnelly D, Wang P. Particle-tethered NADH for production of methanol from CO₂ catalyzed by coimmobilized enzymes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99(3): 508-514
- [9] Li S, Zhang JL, Xu H, et al. Improved xylitol production from D-Arabitol by enhancing the coenzyme regeneration efficiency of the pentose phosphate pathway in *Gluconobacter oxydans*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(5): 1144-1150
- [10] Chen SY, Yang CX, Wu JP, et al. Multi-enzymatic biosynthesis of chiral β -hydroxy nitriles through co-expression of oxidoreductase and halohydrin dehalogenase[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2013, 355(16): 3179-3190
- [11] Gao HB, Yang YE, Zhong QD, et al. Determination of glucose content in grape wine by hexokinase[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2010(12): 84-86 (in Chinese)
高红波, 杨艳娥, 钟其顶, 等. 己糖激酶法测定葡萄酒中葡萄糖的含量[J]. *酿酒科技*, 2010(12): 84-86
- [12] Guo C, Ludvik AE, Arlotto ME, et al. Coordinated regulatory variation associated with gestational hyperglycaemia regulates expression of the novel hexokinase *HKDC1*[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6069
- [13] Weckbecker A, Hummel W. Cloning, expression, and characterization of an (*R*)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2006, 24(5): 380-389
- [14] Song LL, Chen SY, Wu JP, et al. Biosynthesis of R-3-hydroxybutric acid (3HB) by constructing engineering bacteria with Duet compatible vectors[J]. *Industrial Microbiology*, 2014, 44(3): 19-24 (in Chinese)
宋琳琳, 陈少云, 吴坚平, 等. 利用 Duet 系列共表达载体构建工程菌生物合成 3-羟基丁酸(3HB)[J]. *工业微生物*, 2014, 44(3): 19-24
- [15] Sørensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4(1): 1
- [16] Jin MJ, Wu JP, Xu G, et al. Cloning and effective expression of acetolactate synthase[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(11): 1589-1596 (in Chinese)
金美娟, 吴坚平, 徐刚, 等. 乙酰乳酸合成酶基因的克隆与高效表达[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(11): 1589-1596