

• 工业生物技术 •

多聚磷酸盐激酶双底物通道腔的理性设计及其在无细胞催化生产谷胱甘肽中的应用

高惠¹, 王晴¹, 刘婷婷², 徐美娟^{1*}, 饶志明¹

¹ 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

² 烟台欣和企业食品有限公司, 山东 烟台 264006

高惠, 王晴, 刘婷婷, 徐美娟, 饶志明. 多聚磷酸盐激酶双底物通道腔的理性设计及其在无细胞催化生产谷胱甘肽中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3318-3335.

GAO Hui, WANG Qing, LIU Tingting, XU Meijuan, RAO Zhiming. Rational design of polyphosphate kinase dual-substrate channel cavity for efficient production of glutathione by cell free catalysis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3318-3335.

摘 要: 三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)是一种重要的辅助因子, 参与许多需能的生物催化反应。多聚磷酸盐激酶(polyphosphate kinases, PPK)由于其底物聚磷酸盐廉价易得, 可以为消耗 ATP 的反应提供能量。本研究选择哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*)来源的 ChPPK, 进行了底物谱和耐受性分析, 通过分子对接和定点突变, 理性改造多聚磷酸盐激酶的双底物通道腔来提高 PPK 酶的催化活性。与野生型相比, 筛选得到突变体 ChPPK_{K81H-K103V} 的相对酶活提高了 326.7%, 同时, 双突变扩大了 ChPPK 的底物利用范围与耐受性, 提高了该酶的耐热性与耐碱性。基于该 ATP 再生系统, 本研究偶联谷胱甘肽双功能酶 GshAB 和 ChPPK_{K81H-K103V}, 破细胞后采用无细胞催化生产谷胱甘肽, 加入 5 mmol/L ATP 后, 该体系 6 h 可以生产 (25.4±1.9) mmol/L 的谷胱甘肽, 比突变前的催化体系提高了 41.9%。优化无细胞催化体系的缓冲液、裂解液菌体量、补料时间后, 无细胞体系可产生 (45.2±1.8) mmol/L 谷胱甘肽, 底物 L-半胱氨酸的转化率达到 90.4%。提高 ChPPK 生产 ATP 的能力, 可有效增强底物的转化率, 降低催化成本, 实现了无细胞催化生产谷胱甘肽的高产量、高转化率与高经济价值的统一。本研究提供了一种绿色高效的 ATP 再生系统, 可为消耗 ATP 的生物催化反应平台提供可持续动力。

关键词: 多聚磷酸盐激酶; ATP 再生; 突变; 无细胞催化; 谷胱甘肽

资助项目: 国家自然科学基金(32070035); 国家重点研发计划(2018YFA0900300); 中央高校基本科研专项资金(JUSRP221012); 高等学校学科创新引智计划(111-2-06)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070035), the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900300), the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (JUSRP221012), and the 111 Project (111-2-06).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-01-08; Accepted: 2023-03-24

Rational design of polyphosphate kinase dual-substrate channel cavity for efficient production of glutathione by cell free catalysis

GAO Hui¹, WANG Qing¹, LIU Tingting², XU Meijuan^{1*}, RAO Zhiming¹

¹ The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² Yantai Xinxhe Enterprise Food Co., Ltd., Yantai 264006, Shandong, China

Abstract: ATP is an important cofactor involved in many biocatalytic reactions that require energy input. Polyphosphate kinases (PPK) can provide energy for ATP-consuming reactions due to their cheap and readily available substrate polyphosphate. We selected *Ch*PPK from *Cytophaga hutchinsonii* for substrate profiling and tolerance analysis. By molecular docking and site-directed mutagenesis, we rationally engineered the dual-substrate channel cavity of polyphosphate kinase to improve the catalytic activity of PPK. Compared with the wild type, the relative enzyme activity of the screened mutant *Ch*PPK_{K81H-K103V} increased by 326.7%. Meanwhile, the double mutation expanded the substrate utilization range and tolerance of *Ch*PPK, and improved its heat and alkali resistance. Subsequently, we coupled the glutathione bifunctional enzyme GshAB and *Ch*PPK_{K81H-K103V} based on this ATP regeneration system, and glutathione was produced by cell-free catalysis upon disruption of cells. This system produced (25.4±1.9) mmol/L glutathione in 6 h upon addition of 5 mmol/L ATP. Compared with the system before mutation, glutathione production was increased by 41.9%. After optimizing the buffer, bacterial mass and feeding time of this system, (45.2±1.8) mmol/L glutathione was produced in 6 h and the conversion rate of the substrate L-cysteine was 90.4%. Increasing the ability of *Ch*PPK enzyme to produce ATP can effectively enhance the conversion rate of substrate and reduce the catalytic cost, achieving high yield, high conversion rate and high economic value for glutathione production by cell-free catalysis. This study provides a green and efficient ATP regeneration system that may further power the ATP-consuming biocatalytic reaction platform.

Keywords: polyphosphate kinase; ATP regeneration; mutation; cell-free catalysis; glutathione

三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)是生物体内必需的高能磷酸化合物,它为活细胞内的合成、运输和信息传递等过程提供能量^[1]。在酶催化中,ATP通常作为基团转移的辅助因子,参与生产高价值的产品。生物催化中需能反应大多是发生在ATP、ADP和AMP之间的磷酸转移,例如,ATP驱动形成酰胺键^[2]、二肽^[3]、谷氨酰

胺^[4]、谷胱甘肽^[5]和S-腺苷甲硫氨酸^[6]等。考虑到生物反应的时间和反应成本,添加大量的ATP似乎并不可行,这就要求寻求ATP供应方法的可持续性和高效性。无机聚磷酸盐(polyphosphate, polyP)是具有几种磷酸盐的一种线性聚合物,已在包含古菌、细菌和真核生物的所有活细胞中发现,可作为压力和生存、能量、细胞运动、生物

膜形成和金属离子螯合剂^[7]。近年来,多聚磷酸盐激酶(polyphosphate kinases, PPK)催化的无机聚磷酸盐与 ATP 的可逆反应备受关注。PPK 可以分为 2 个家族,即 PPK1 和 PPK2^[8],PPK1 倾向于以 ATP 末端的磷酸基团为底物合成 polyP,例如,大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源的 PPK^[9]就属于典型的 PPK1 类。PPK2 则表现出相反的特性,可以催化 polyP 作为腺苷磷酸化的供体^[10]。目前,双功能的多聚磷酸盐激酶 PPK 引起人们的广泛关注,该酶利用廉价易得的磷酸盐(polyP)作为底物,属于 PPK2-III 类^[11],既可以催化腺苷生成二磷酸腺苷,也可催化二磷酸腺苷生成三磷酸腺苷。

谷胱甘肽(glutathione, GSH)是所有生物中含量最多的非蛋白质硫醇化合物,具有抗氧化剂、解毒剂和免疫助推器的能力,广泛应用于医疗、食品和化妆品行业^[12]。发酵法生产谷胱甘肽的出发菌株主要是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[13],Chen 等^[14]运用氧化应激和能量代谢策略提高酿酒酵母发酵法生成谷胱甘肽的产量,最终累积产 5.76 g/L 的谷胱甘肽;Schmacht 等^[15]对培养基成分进行优化及采用不同的半胱氨酸流加策略后,最终酿酒酵母生成(1 459±57) mg/L 的谷胱甘肽。最近,在无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)中发现了一种谷胱甘肽双功能酶(GshF)^[16],它可以直接催化前体谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸合成 GSH,伴随 2 分子 ATP 的消耗。Liu 等^[16]在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中构建了 GshAB 酶生产谷胱甘肽的代谢工程途径,在不添加半胱氨酸和谷氨酸的前提下,产生 756 mg/L 的谷胱甘肽。Zhang 等^[17]在大肠杆菌过表达 GshAB 酶,并对谷胱甘肽的代谢途径进行干扰,在添加前体半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸后,补料发酵最终生产 5.87 g/L 的谷胱甘肽。Yang 等^[18]在大肠杆菌

全细胞催化体系中添加 80 mmol/L ATP,最终产生 11.2 g/L 的谷胱甘肽。发酵法生产谷胱甘肽的产量并不高,原因可能是存在细胞膜屏障、底物限制和产物运输等问题^[19],而全细胞催化存在添加大量 ATP 导致成本高的问题。在偶联 ATP 再生体系后,纯酶催化可以减少 ATP 的使用,得到高产量的谷胱甘肽。Cao 等^[20]在 GshAB 与 PPK 纯酶体系中添加 20 mmol/L ADP 可产生 12.32 g/L 的谷胱甘肽,转化率达到 80.24%。Zhang 等^[21]将纯化的 GshAB 酶与 PPK 湿细胞混合,一锅法生产得到 8.8 g/L 的谷胱甘肽,产率达到 81.4%。基于 PPK 再生体系的加入,可减少谷胱甘肽的生产成本,但纯酶催化仍然存在 ATP 再生效率低、操作繁琐等问题。

本研究对 ChPPK 酶进行了底物谱分析和底物耐受性分析,通过分子对接和定点突变,首次扩大多聚磷酸盐激酶的双底物通道腔,筛选到酶活显著提高的 PPK 突变体,提高了 PPK 酶的催化效率;同时,该突变也提高了底物聚磷酸盐的利用范围和耐受性,该酶的耐热性和耐碱性也有一定的提高。基于该突变酶高效的 ATP 供给能力开发了 ATP 再生平台来生产谷胱甘肽。在大肠杆菌中构建了生产谷胱甘肽的途径,以无细胞裂解液的形式催化谷胱甘肽的生产,该裂解液为 ATP 再生系统生产谷胱甘肽提供内源性的 ATP,构建了可持续的 ATP 再生模型,对无细胞催化体系优化后实现了高效生产谷胱甘肽。这种高效的 ATP 再生系统大大降低了生产成本,拓宽了底物选择范围,提高了底物的耐受性,将进一步应用于生物催化反应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

质粒 pET-28a、大肠杆菌(*Escherichia coli*)

BL21(DE3)均为本实验室保存。来源哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*) (GenBank 登录号: WP_011583516.1)的 *ChPPK* 和来源无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的 *gshAB* (GenBank 登录号: NZ_CP012480.1)由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10。固体培养基加入 1.8% (质量体积分数)琼脂。

1.1.3 试剂

三偏磷酸钠 polyP_3 、六偏磷酸钠 polyP_6 和多偏磷酸钠 polyP_n 购于阿拉丁(上海)有限公司, 己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸激酶购于默克 Sigma-Aldrich 试剂公司, 谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、谷胱甘肽、ATP 购于生工生物工程(上海)股份有限公司, 其余化学品均购自麦克林(上海)试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 重组大肠杆菌菌株的构建

文章中构建的菌株见表 1, 使用的引物见表 2。

ChPPK 与 *gshAB* 基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 获得质粒 pET-28a-*ChPPK*、pET-28a-GshAB。按照前人的方法^[4]构建获得 *E. coli* BL21/pET-28a-*ChPPK*、*E. coli* BL21/pET-28a-GshAB, 并将 *E. coli* BL21/pET-28a-GshAB 命名为 EC01。分别以质粒 pET-28a-*ChPPK* 和 pET-28a-*ChPPK*_{K81H-K103V} 为模板, 以引物 P3/P4 扩增得到 *ChPPK* 与 *ChPPK*_{K81H-K103V} 片段, 构建得到 *E. coli* BL21/pET-28a-GshAB-*ChPPK*、*E. coli* BL21/pET-28a-GshAB-*ChPPK*_{K81H-K103V}, 分别命名为 EC02、EC03。

表 1 本研究使用的菌株

Table 1 Strains used in this research

Strains	Relevant characteristic (s)	Source
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	The host of the recombinant protein	Laboratory
EB01	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> in pET28a(+) plasmids	In this work
EB02	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K81T} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB03	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K81H} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB04	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K103V} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB05	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K103G} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB06	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K103D} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB07	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K81T-K103V} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB08	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K81T-K103G} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB09	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K81T-K103D} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB10	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K81H-K103V} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB11	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K81H-K103G} in pET28a(+) plasmids	In this work
EB12	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression <i>ChPPK</i> _{K81H-K103D} in pET28a(+) plasmids	In this work
EC01	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression GshAB in pET28a(+) plasmids	In this work
EC02	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression GshAB and <i>ChPPK</i> in pET28a(+) plasmids	In this work
EC03	<i>E. coli</i> BL21(DE3), expression GshAB and <i>ChPPK</i> _{K81H-K103V} in pET28a(+) plasmids	In this work

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this research

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
P1	cctgtggcgccggtgatccggcc	24
P2	atccggatagttctccttca	24
P3	cccgaaggaagcgggtctggcaaatattctgaaatgag	39
P4	ccaagctgaattcgagctcgtagtggtggtggtggtgatcgg	46
P5	accaccaccaccactaacgagctcgaattcagcttgctgt	44
P6	agaatattgccagaaccgcttctcggccttgtagcag	43
P7 (K103V)	tgacttcctctggtgcatccaagatcgaactgtccca	40
P8 (K103V)	tggcaccacgaaggaagtcaccttcacgccttggtg	35
P9 (K103G)	tgacttccttcggcgtgccatccaagatcgaactgtccca	40
P10 (K103G)	tggcacgccgaaggaagtcaccttcacgccttggtg	35
P11 (K103D)	tgacttccttcgatgtgccatccaagatcgaactgtccca	40
P12 (K103D)	tggcacatcgaaggaagtcaccttcacgccttggtg	35
P13 (K81H)	atgcagccggccacgatggcaccgtgaagcacatc	35
P14 (K81H)	caagcaatggatgcagccggccacgatggcaccgtgaa	38
P15 (K81T)	atgcagccggcaccgatggcaccgtgaagcacatc	35
P16 (K81T)	ccaagcaatggatgcagccggcaccgatggcacc	34

1.2.2 培养方法

菌株活化：甘油管中取 10 μ L 菌液，在相应抗性的固体培养基上划线，获得单菌落。挑取单菌落，接种到小瓶液体培养基中，大肠杆菌 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。

大肠杆菌的摇瓶培养与诱导：从小瓶液体培养基中按 1% (体积分数) 的接种量接种到 50 mL 的 LB 液体培养基中，加入浓度为 50 μ g/mL 的卡纳霉素抗生素，37 $^{\circ}$ C 培养约 2 h。OD₆₀₀ 约为 0.8 时，添加 0.2 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 诱导表达，16 $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养 14 h。

1.2.3 蛋白的破碎与纯化

将细胞悬浮于 200 mmol/L 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.4) 中，4 $^{\circ}$ C 超声裂解 15 min，将得到的裂解液于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 25 min，收集液体上清。上清液用 Ni²⁺-NTA 柱纯化，得到纯酶^[22]。通过 SDS-PAGE 对纯化后的蛋白进行分析，蛋白质浓

度由 Bradford 方法测定^[23]。

1.2.4 PPK 的酶活测定

PPK 酶活测定的反应体系 (2 mL) 包含 (终浓度) 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、20 mmol/L 葡萄糖、20 mmol/L NADP、50 mmol/L MgCl₂、20 mmol/L ADP、50 mmol/L polyP、5 U 己糖激酶、5 U 葡萄糖-6-磷酸激酶和 100 μ L 纯酶^[24]。研究不同长度 (polyP₃、polyP₆ 和 polyP_n)、不同浓度下 (50、100、150 和 200 mmol/L) 的磷酸盐对 PPK 的酶活影响。反应在 35 $^{\circ}$ C 下进行 30 min，沸水中煮沸 5 min 以终止酶反应，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液在 340 nm 处测定吸光度。PPK 的酶活 (1 U) 定义为每 min 产生 1 μ mol ATP 所需的酶量。

PPK 酶的最适温度测定：将体系分别放于 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 不同温度下反应 30 min，按照上述方法测定酶活。用相对酶活 (%) 表示，最高的比酶活作为 100%。

PPK 酶的最适 pH 测定:将体系分别放于 pH 为 6.0–9.5 的不同缓冲体系中,35 °C 反应 30 min,按照上述方法测定酶活。用相对酶活(%)表示,最高的比酶活作为 100%。

1.2.5 蛋白结构分析

采用 Swiss-model 预测 ChPPK 蛋白的三维结构,利用 Schrodinger-glide 对接底物与蛋白质,通过对接分析选择最佳的对接位置^[25]。均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)反映了分子结构随时间的位置变化程度(移位度),均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)代表了分子中每个原子的运动自由度,使用 GROMACS 进行 RMSD 和 RMSF 分析^[26]。使用 Pymol 软件对蛋白质进行可视化。

1.2.6 定点突变

野生型 ChPPK 的 K81 位点定点突变为 T、H, K103 位点定点突变为 V、G、D, 基因位点的突变通过设计包含特定突变序列的引物来实现定点突变^[27], 定点突变所涉及的引物见表 2。PCR 条件:以 pET-28a-ChPPK 为 DNA 模板,扩增条件为:95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。获得的重组质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司测序验证。

1.2.7 PPK 酶的动力学参数测定

采用双倒数法测定 PPK 酶的 K_m 和 V_{max} 值^[28]。在 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中分别测定了不同浓度的 ADP (0.1–5 mmol/L) 和 polyP₆ (10–75 mmol/L) 对野生型(wild type, WT)酶和突变酶的反应速率。

1.2.8 GshAB 的酶学性质测定

GshAB 酶活测定采用四氧嘧啶法^[24]。反应体系(2 mL)包含(终浓度) 200 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.0)、7.5 g/L 甘氨酸、1 g/L 四氧嘧啶和 100 μ L 纯酶。反应在 35 °C 下进行 30 min, 沸水

中煮沸 5 min 以终止酶反应, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液在 305 nm 处测定吸光度。GshAB 的酶活(1 U)定义为每 min 产生 1 μ mol 产物所需的酶量。

GshAB 酶的最适温度测定:将反应体系分别放于 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C 不同温度下反应 30 min, 按照上述方法测定酶活。用相对酶活(%)表示, 最高的比酶活作为 100%。

GshAB 酶的最适 pH 测定:反应体系分别放于 pH 为 6.0–9.5 的 200 mmol/L 不同缓冲体系中, 35 °C 反应 30 min, 按照上述方法测定酶活。用相对酶活(%)表示, 最高的比酶活作为 100%。

GshAB 酶的温度稳定性测定:将纯化的 GshAB 酶置于上述不同温度下, 于最适 pH 条件下每隔 2 h 取样测定酶活, 分析温度稳定性。

GshAB 酶的 pH 稳定性测定:将纯化的 GshAB 酶置于不同 pH 的缓冲液中, 于最适温度下每隔 2 h 取样测定酶活, 分析 pH 稳定性。

1.2.9 无细胞裂解液的提取

分别将 EC01、EC02、EC03 的单菌落接种到 10 mL LB 液体小瓶中, 37 °C 培养 18 h, 按 1% (体积分数) 接种量接种到 100 mL LB 培养基中, 37 °C 培养 2 h, OD_{600} 约为 0.8 时, 加入 0.2 mmol/L IPTG, 16 °C 培养 18 h。收集菌体, 加入 800 mL PBS 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)重悬细胞(OD_{600} 为 10), 高压匀浆机破碎细胞 15 min, 破碎后的裂解液备用。

1.2.10 无细胞催化生产谷胱甘肽

发酵罐 EC01 无细胞生产谷胱甘肽体系(1 L): PBS 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)包含谷氨酸 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, 半胱氨酸 50 mmol/L, ATP 100 mmol/L, $MgCl_2$ 20 mmol/L, 二硫糖苏糖醇(disulfrosethritol, DTT) 4 mmol/L, OD_{600} 为 10 的细胞裂解液 800 mL。

用 NaOH 调 pH 为 8.0, 37 °C 反应。发酵罐 EC02 和 EC03 无细胞生产谷胱甘肽体系(1 L): PBS 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)包含谷氨酸 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, 半胱氨酸 50 mmol/L, ATP 5 mmol/L, polyP₆ 100 mmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, DTT 4 mmol/L, *OD*₆₀₀ 为 10 的细胞裂解液 800 mL。用 NaOH 调 pH 为 8.0, 37 °C 反应。

1.2.11 无细胞催化缓冲液的优化

发酵罐 EC01 无细胞生产谷胱甘肽体系(1 L): PBS/Tris-HCl/甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)包含谷氨酸 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, 半胱氨酸 50 mmol/L, ATP 100 mmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, DTT 4 mmol/L, *OD*₆₀₀ 为 10 的细胞裂解液 800 mL。用 NaOH 调 pH 为 8.0, 37 °C 反应。发酵罐 EC03 无细胞生产谷胱甘肽体系(1 L): PBS/Tris-HCl/甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)包含谷氨酸 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, 半胱氨酸 50 mmol/L, ATP 5 mmol/L, polyP₆ 100 mmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, DTT 4 mmol/L, *OD*₆₀₀ 为 10 的细胞裂解液 800 mL。用 NaOH 调 pH 为 8.0, 37 °C 反应。

1.2.12 裂解液菌体量的优化

发酵罐 EC01 无细胞生产谷胱甘肽体系(1 L): Tris-HC 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)包含谷氨酸 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, 半胱氨酸 50 mmol/L, ATP 100 mmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, DTT 4 mmol/L, *OD*₆₀₀ 为 5、10、15、20 的细胞裂解液 800 mL。用 NaOH 调 pH 为 8.0, 37 °C 反应。发酵罐 EC03 无细胞生产谷胱甘肽体系(1 L): Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)包含谷氨酸 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, 半胱氨酸 50 mmol/L, ATP 5 mmol/L, polyP₆ 100 mmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, DTT 4 mmol/L, *OD*₆₀₀ 为 5/10/15/20 的细胞裂解液 800 mL。用 NaOH 调 pH 为 8.0, 37 °C 反应。

1.2.13 无细胞催化补料时间的优化

发酵罐 EC01 无细胞生产谷胱甘肽体系(1 L): Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)包含谷氨酸 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, 半胱氨酸 50 mmol/L, ATP 100 mmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, DTT 4 mmol/L, *OD*₆₀₀ 为 15 的细胞裂解液 800 mL。补料时间分别为一次性全部加入底物谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸 50 mmol/L; 0 h 和 2 h 分 2 批次加入底物谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸(即每次加入 25 mmol/L), 0、2 和 4 h 分 3 批次加入底物谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸(即每次加入 16.6 mmol/L); 用 NaOH 调 pH 为 8.0, 37 °C 反应。发酵罐 EC03 无细胞生产谷胱甘肽体系(1 L): Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)包含谷氨酸 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, 半胱氨酸 50 mmol/L, ATP 5 mmol/L, polyP₆ 100 mmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, DTT 4 mmol/L, *OD*₆₀₀ 为 15 的细胞裂解液 800 mL。补料时间分别为一次性全部加入底物谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸 50 mmol/L 和 100 mmol/L polyP₆; 0 h 和 2 h 分 2 批次加入底物谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸(即每次加入 25 mmol/L)和 polyP₆ (即每次加入 50 mmol/L), 0、2 和 4 h 分 3 批次加入底物谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸(即每次加入 16.6 mmol/L)和 polyP₆ (即每次加入 33.3 mmol/L); 用 NaOH 调 pH 为 8.0, 37 °C 反应。

1.2.14 谷胱甘肽的测定

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定谷胱甘肽含量^[17]。流动相 A 为含 10 mmol/L 庚烷磺酸钠的 50 mmol/L KH₂PO₄ (调 pH 3.0), 流动相 B 为纯甲醇溶液, 流动相 A/B (体积比)为 95/5, 使用 Agilent 1260 Infinity HPLC 系统, 色谱条件为: C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min, WVD 检测器波长 210 nm, 进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 *ChPPK* 酶的克隆、表达与酶学性质测定

选择来源哈氏噬纤维菌 (*Cytophaga hutchinsonii*) 的 *ChPPK* 在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 中克隆表达。纯化后对其酶学性质研究发现, 含有不同长度、不同浓度的磷酸盐 polyP 对 PPK 的酶活有显著差异, 如图 1A 所示, 在 50 mmol/L 的磷酸盐浓度下, 六偏磷酸钠 polyP₆ 显示对 *ChPPK* 的比酶活最大, 为 (30.52 ± 2.08) U/mg, 其次是多偏磷酸钠 polyP_n, 比酶活为 (17.31 ± 1.54) U/mg, 而 *ChPPK* 对底物三偏磷酸钠 polyP₃ 几乎不显示出催化活性, 比酶活为 (1.52 ± 0.79) U/mg。随着磷酸盐浓度的增加, PPK 酶的比酶活逐渐降低, 在 100、150 和 200 mmol/L 的 polyP₃ 浓度下, *ChPPK* 酶无催化活性; 而与 50 mmol/L polyP₆ 相比, 底物 polyP₆ 浓度为 200 mmol/L 时, *ChPPK* 的比酶活降低了 66.5%; polyP_n 的浓度增加到 200 mmol/L, 对 *ChPPK* 酶的比酶活也急剧降低, 最终降低到 0。因此, 选择六偏磷酸钠 polyP₆ 用于后续实验, 同时为了提高 *ChPPK* 对 polyP₆ 的耐受力, 增强 ATP 的供给能力, 针对 *ChPPK* 的分子改造是很有必要的。

此外还研究了 *ChPPK* 酶的最适温度和最适 pH。如图 1B 所示, *ChPPK* 酶的最适温度为 35 °C, *ChPPK* 酶的相对酶活随着温度的增加先升高后降低, 当温度为 30 °C 和 40 °C 时, 相对酶活仍然维持在 90% 以上, 温度为 25 °C、45 °C、50 °C 和 55 °C 时, 相对酶活分别为 75.9%、75.5%、50.9%、35.1%, 而当温度升高到 60 °C 时, 相对酶活仅剩 15.8%。如图 1C 所示, 随着 pH 的上升, *ChPPK* 酶的相对酶活先上升后降低, *ChPPK* 酶的最适 pH 为 8.0, pH 为 7.0 和 7.5 时, 相对酶活分别为 90.3% 和 95.5%, pH 为 6.0、6.5、8.5、9.0 和 9.5 时, 相对酶活分别下降到 65.2%、80.7%、83.2%、50.5% 和 5.7%, 说明该酶不适合强碱环境。

2.2 分子对接与结构分析

ChPPK 蛋白的活性位点与底物 polyP₆ 和 ADP 相互作用, 活性通道周围的残基对酶活性有重要影响。将 *ChPPK* 的蛋白质结构与底物 polyP₆ 和 ADP 对接, 如图 2A 所示, *ChPPK* 蛋白主体部分的左右两侧都是 α -螺旋链, 中间包裹着 β -折叠, 上方是有一个类似于盖子的螺旋结构。主体和盖子的中间形成一个空腔, 该空腔是 polyP₆ 和 ADP 之间磷酸基团转移的位置。如

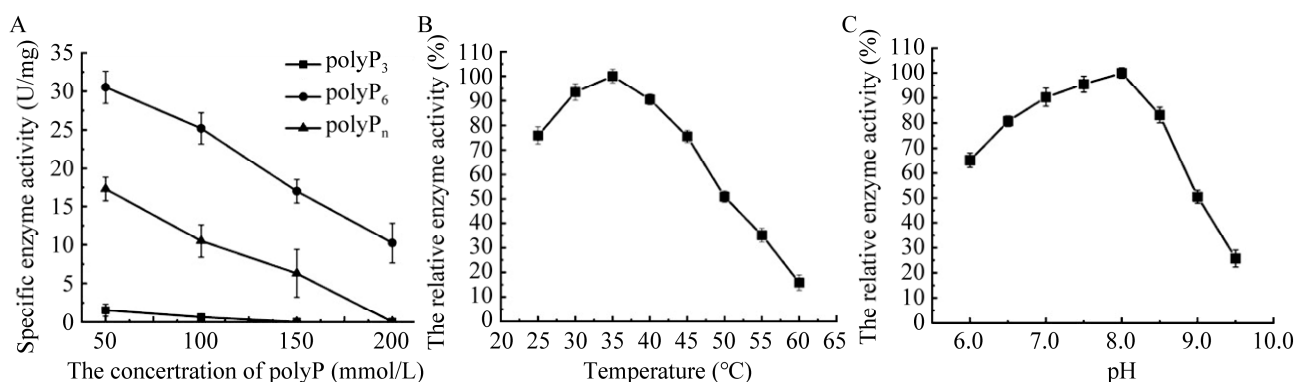


图 1 不同底物浓度 polyP₃、polyP₆ 和 polyP_n 对 *ChPPK* 的酶活影响(A)以及 *ChPPK* 的最适温度(B)和最适 pH (C)

Figure 1 Enzymatic properties of *ChPPK*. A: Effect of polyP₃, polyP₆ and polyP_n concentration on enzyme activity of *ChPPK*. B: The optimum temperature of *ChPPK*. C: The optimum pH of *ChPPK*.

图 2B 所示, 对接后显示 polyP₆ 和 ADP 与 D77、K81、K103 和 R133 残基形成离子相互作用。蛋白质表面或内部存在部分残基能够与底物结合并发生催化反应, 该空间形成的空腔即可作为酶的活性口袋, 而活性口袋的灵活性影响酶的催化活性^[29], 因此, 对 *Ch*PPK 蛋白的结构分析后发现双底物 polyP₆ 和 ADP 通道入口处的 K81 和 K103 残基可能会影响底物的进入, 进一步影响该酶活性口袋的灵活性, 并推测可以对双底物通道腔进行理性设计, 扩大底物的通道, 让更多的底物进入活性中心, 从而提高酶的活性。

选择 K81 和 K103 两个残基位点, 运用 Pymol 软件对这 2 个位点进行突变, 测定残基 D77 和 K81 之间的距离以及残基 K81 和 K103

之间的距离。如图 2C 所示, 突变前, 残基 D77 的氧原子与残基 K81 的氮原子之间距离为 5.2 Å, 残基 K81 的氮原子与残基 K103 的氮原子之间的距离为 8.1 Å。对残基 K81 与 K103 进行突变, 通过 Pymol 软件进行可视化, 如图 2D 所示, 展示了残基之间距离扩大的突变点, 残基 D77 与 T81 距离为 6.0 Å, T81 与 D103、G103、V103 距离分别为 11.4 Å、13.0 Å、14.0 Å; 残基 D77 与 H81 距离为 6.5 Å, H81 与 D103、G103、V103 距离分别为 10.2 Å、10.3 Å、12.9 Å。T81、H81 与 D103、G103、V103 的突变使双底物 polyP₆ 和 ADP 的通道入口变大, 因此, 选择 K81T、K81H、K103D、K103G 和 K103V 用于后续的突变实验。

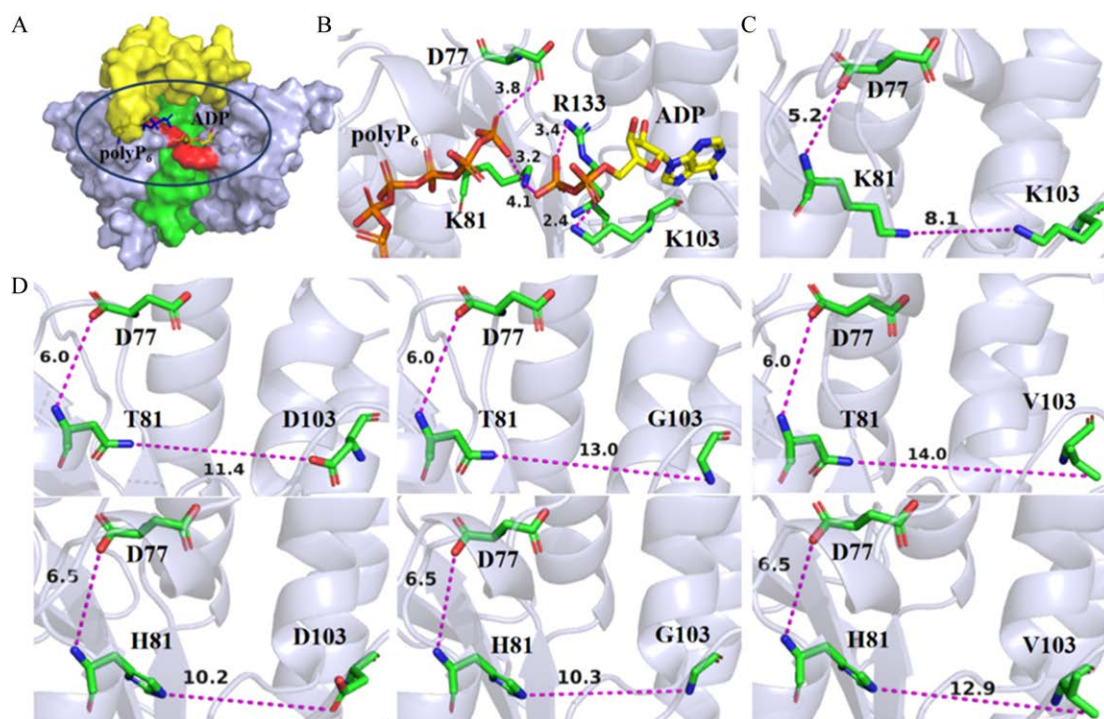


图 2 *Ch*PPK 与底物对接的三维结构以及突变前后通道入口处氨基酸之间距离的变化

Figure 2 The 3D structure of *Ch*PPK docking with the substrates and the changes of the distance between the amino acids at the channel entrance before and after mutation. A: The structure of *Ch*PPK enzyme. B: Interaction of the substrates ADP and polyP₆ with residues. C: The distance of the channel entrance before the mutation. D: The distance of the enlarged channel entrance after the mutation.

2.3 定点突变及酶活测定比较

分别将 K81 和 K103 两个残基位点进行定点突变, 通过 Ni^{2+} -NTA 柱亲和层析纯化, 突变酶的纯化结果如图 3A 所示, 随后将野生型 WT 和突变酶分别在 35 °C 反应 30 min, 测定其酶活。如图 3B 所示, 81 位定点突变中, 突变酶 K81H 相对酶活较野生型提高显著, 提高了 55.5%, 而突变酶 K81T 的相对酶活提高了 27%。103 位定点突变中, 与野生型相比, K103D、K103G、K103V 的相对酶活分别提高了 33%、40% 和 76.5%, 这也证明了通过理性改造, 扩大双底物 ADP 与 polyP_6 的通道腔, 可以有效地提高 ChPPK 的催化活性。

针对以上相对酶活提高的单突变酶, 构建了 6 个双突变酶, 并测定了双突变酶的相对酶活, 期望获得酶活提高更显著的突变酶。如图 3B 所示, 双突变酶 K81H-K103V 展现最高的催化活性, 与野生型相比, 相对酶活提高到 326.7%。因此, 后续针对双突变酶 ChPPK_{K81H-K103V} 进行酶学性质研究。

2.4 突变酶的酶学性质测定与 MD 模拟分析

为了探究突变酶 ChPPK_{K81H-K103V} 对不同长度、不同浓度的磷酸盐 polyP 的酶活影响, 测定了不同浓度的 polyP_3 、 polyP_6 、 polyP_n 条件下突变酶的比酶活。如图 4A 所示, 突变酶仍然显示出对 50 mmol/L 六偏磷酸钠 polyP_6 最高的比酶活, 为 (98.3 ± 2.8) U/mg, 其次是多偏磷酸钠, 为 (74.3 ± 2.1) U/mg, 而突变酶对底物 polyP_3 的催化活性由原来的几乎无活性增加到 (11.9 ± 1.2) U/mg, 该突变扩大了 ChPPK 酶的底物谱范围。而突变酶在 50、100、150 和 200 mmol/L 的磷酸盐条件下, 耐受力均有所提高, 在 100、150 和 200 mmol/L 的 polyP_3 条件下, ChPPK 的比酶活分别增加至 (8.2 ± 2.1) U/mg、 (6.3 ± 1.5) U/mg、 (5.1 ± 2.6) U/mg; 与 50 mmol/L polyP_6 相比, 200 mmol/L polyP_6 下该突变酶的相对酶活仅降低了 36.3%, 为 (63.9 ± 2.9) U/mg; 200 mmol/L 的 polyP_n 条件下, 该酶显示出催化活性, 比酶活为 (35.8 ± 2.5) U/mg。同时, 测定了突变酶 ChPPK_{K81H-K103V} 在不同温度

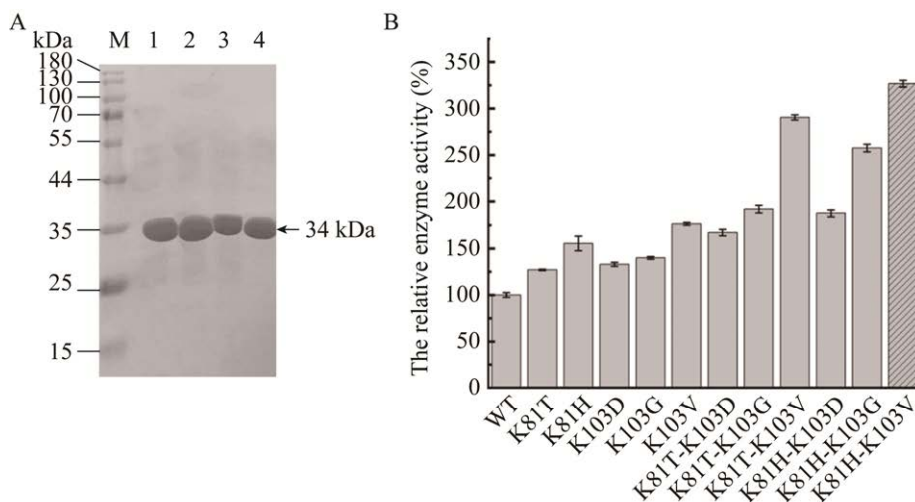


图 3 野生型 WT 和突变酶 K81H、K103V、K81H-K103V 的纯化以及相对酶活的测定

Figure 3 Purification of the wild-type and mutant enzymes K81H, K103V, K81H-K103V and determination of relative enzyme activity. A: SDS-PAGE analysis of the mutant enzymes. M: Marker; 1: WT; 2: K81H; 3: K103V; 4: K81H-K103V. B: Relative enzyme activity of the mutants.

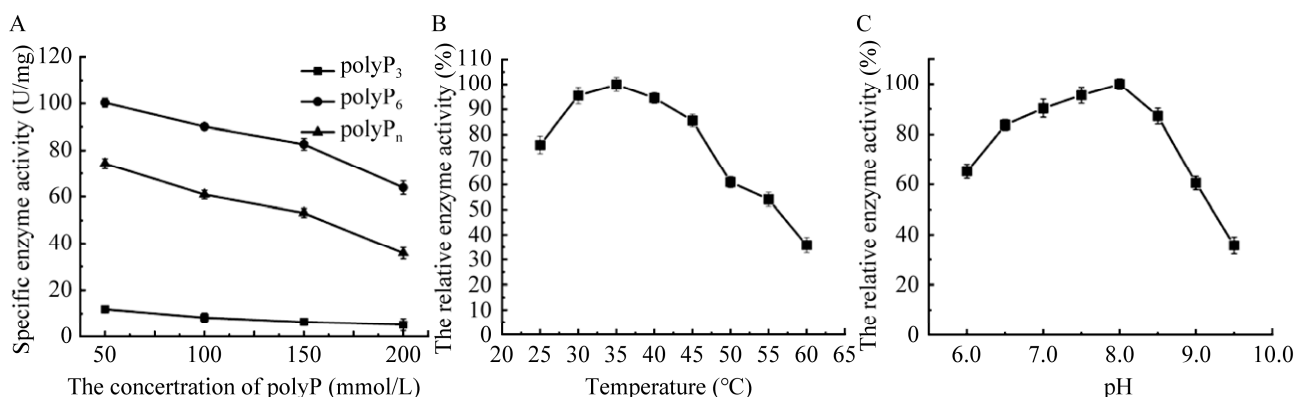


图4 不同底物浓度 polyP₃、polyP₆ 和 polyP_n 对 *ChPPK*_{K81H-K103V} 的酶活影响(A)以及 *ChPPK*_{K81H-K103V} 的最适温度(B)和最适 pH(C)

Figure 4 A: Effect of polyP₃, polyP₆ and polyP_n concentration on enzyme activity of *ChPPK*_{K81H-K103V}. B: The optimum temperature of *ChPPK*_{K81H-K103V}. C: The optimum pH of *ChPPK*_{K81H-K103V}.

与不同 pH 下的酶活变化,如图 4B 所示,突变酶 *ChPPK*_{K81H-K103V} 的最适温度为 35 °C,与野生型相同;在温度 35–60 °C 范围内,突变酶的相对酶活均有所提高,60 °C 时,相对酶活提高到 35.8%。如图 4C 所示,突变酶的最适 pH 与野生型相同,均为 8.0,在 pH 8.0–9.5 时,相对酶活高于野生型,pH 9.5 时,相对酶活提高为 35.7%。由此可见,突变酶 *ChPPK*_{K81H-K103V} 对底物磷酸盐的利用范围扩大,对磷酸盐的耐受力提高,同时,该酶的耐热性和耐碱性均有所提高,H81 与 V103 的双突变有效地提高了 *ChPPK* 酶的催化活性。

此外,进一步研究了突变酶对底物 polyP₆ 和 ADP 的 K_m 和 k_{cat}/K_m 值的影响。如表 3 所示,野生型 WT 对底物 ADP 的 K_m 值为 (1.39 ± 0.07) mmol/L, K81H、K103V 和 K81H-K103V 对底物 ADP 的 K_m 值分别为 (0.90 ± 0.03) mmol/L、 (0.89 ± 0.12) mmol/L 和 (0.63 ± 0.03) mmol/L,说明 K81H 和 K103V 的突变增加了 *ChPPK* 酶对底物 ADP 的亲和力;K81H 和 K103V 对底物 ADP 的 k_{cat}/K_m 值分别比野生型高 2.0 倍和 3.1 倍,双突变体 K81H-K103V 对底物 ADP 的 k_{cat}/K_m 值比野生型高 4.4 倍,说明 K103V 和 K81H 的突变提高了 *ChPPK* 酶的催化效率,双突变体 K81H-K103V 对 *ChPPK* 酶的

催化效率提高更加显著。对底物 polyP₆ 来说,野生型 WT 的 K_m 值为 (2.30 ± 0.02) mmol/L, K81H、K103V 和 K81H-K103V 对底物 polyP₆ 的 K_m 值分别为 (2.00 ± 0.01) mmol/L、 (2.24 ± 0.01) mmol/L 和 (1.96 ± 0.03) mmol/L,单突变 K81H 与双突变 K81H-K103V 对 polyP₆ 的 K_m 值降低明显,说明 K81H 与 K81H-K103V 增加了对 polyP₆ 的亲和力;与野生型相比,K103V 的 k_{cat}/K_m 值增加不大,而 K81H 和 K81H-K103V 的 k_{cat}/K_m 值分别增加了 1.4 倍和 1.5 倍,证实了双突变株 K81H-K103V 的催化活力提高。用 RMSD 和 RMSF 分析了该突变蛋白的柔韧性,如图 5A 所示,RMSD 结果显示野生型 WT、K81H 突变体、K103V 突变体与双突变体 K81H-K103V 的系统波动稳定,分子轨迹处于平衡状态。如图 5B 所示,K81H 和 K103V 的 RMSF 值高于野生型的 RMSF 值,双突变体 K81H-K103V 的 RMSF 值增加,分子结构的灵活性提高,H81 和 V103 残基的波动表明突变蛋白活性中心的柔韧性增加,促进了底物与活性中心之间的相互作用,K81H 和 K103V 的突变扩大了底物 polyP₆ 和 ADP 的通道腔,使更多的底物可以进入活性中心,这是首次通过突变扩大双底物通道腔来提高多聚磷酸激酶的催化活性。

表 3 突变酶的动力学参数

Table 3 Kinetics parameters of the mutant enzymes

Substrates	Mutants	K_m (mmol/L)	k_{cat}/K_m (L/(s·mol))
ADP	WT	1.39 ± 0.07	7.22×10^3
ADP	K81H	0.90 ± 0.03	14.82×10^3
ADP	K103V	0.89 ± 0.12	22.30×10^3
ADP	K81H-K103V	0.63 ± 0.03	31.70×10^3
polyP ₆	WT	2.30 ± 0.02	15.30×10^3
polyP ₆	K81H	2.00 ± 0.01	21.21×10^3
polyP ₆	K103V	2.24 ± 0.01	17.00×10^3
polyP ₆	K81H-K103V	1.96 ± 0.03	23.32×10^3

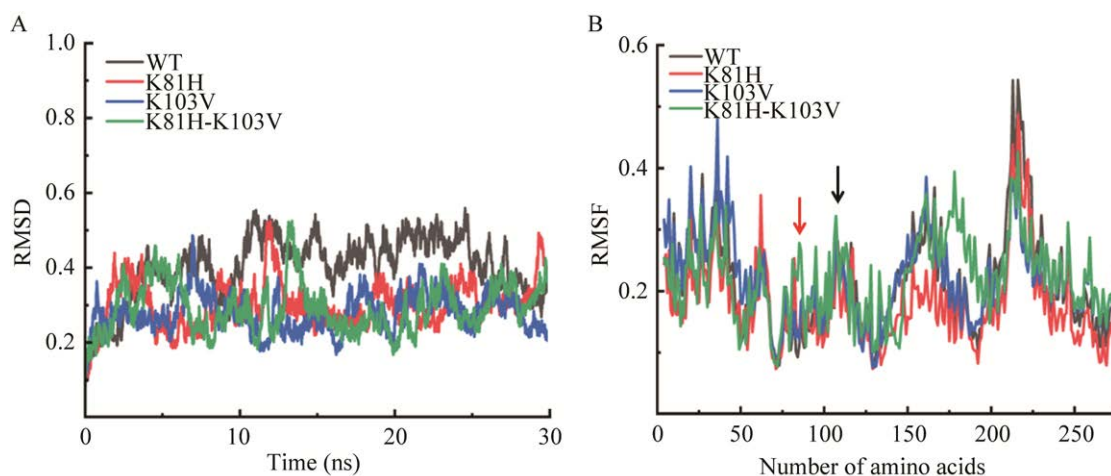


图 5 突变酶的 RMSD (A)和 RMSF (B)分析

Figure 5 MD simulation analysis of the mutant enzyme. A: Comparison of RMSD between the wild type and mutants. B: Comparison of RMSF between the wild type and mutants. Red arrow: The changes of RMSF at residue 81; Black arrow: The changes of RMSF at residue 103.

2.5 GshAB 酶的克隆、表达与酶学性质测定

选择来源无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 的 GshAB 在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 中克隆表达, 纯化后测定 GshAB 的酶活。如表 4 所示, GshAB 的比酶活为 (7.6 ± 1.7) U/mg。同时测定了 GshAB 酶在不同温度 and 不同 pH 下的酶活情况。如图 6A 所示, 温度在 25–40 °C 范围内, GshAB 的相对酶活逐渐升高, 温度在 40–60 °C 范围内, GshAB 的相对酶活逐渐降低, 该酶的最适温度为 40 °C, 在 35 °C 和 45 °C 条件下相对酶活分别为 93.2% 和 95%, 温度升高到 60 °C 时, GshAB 的相对酶活仅剩 37%。如图 6B

所示, GshAB 的相对酶活随着 pH 升高先上升后降低, 最适 pH 为 8.0, 说明该酶偏向于碱性环境。随后, 测定了该酶的温度稳定性和 pH 稳定性。如图 6C 和 6D 所示, 不同温度与不同 pH 下的相对酶活随着孵育时间逐渐下降, 最适温度 40 °C 时, 24 h 时相对酶活仅剩 39%, 45 °C 时相对酶活下降到 33.9%, 而在 35 °C 时, 24 h 的相对酶活仍然保持 64.5%, 因此, 最适温度 40 °C 下酶的稳定性差, 35 °C 下 GshAB 酶的热稳定性较好; 而最适 pH 8.0 下, 24 h 时相对酶活仍保持在 75% 左右, pH 7.5 时 24 h 的相对酶活为 50%, pH 8.5 时 24 h 的相对酶活为 57.8%。

表 4 GshAB 酶的酶活

Table 4 The enzyme activity of GshAB

Enzyme	Enzyme activity (U/mL)	Protein concentration (mg/mL)	Specific enzyme activity (U/mg)
Purified GshAB	7.60±1.30	1.42±0.75	5.35±1.70
GshAB in the lysate	6.55±1.43	11.1±1.10	0.59±1.30

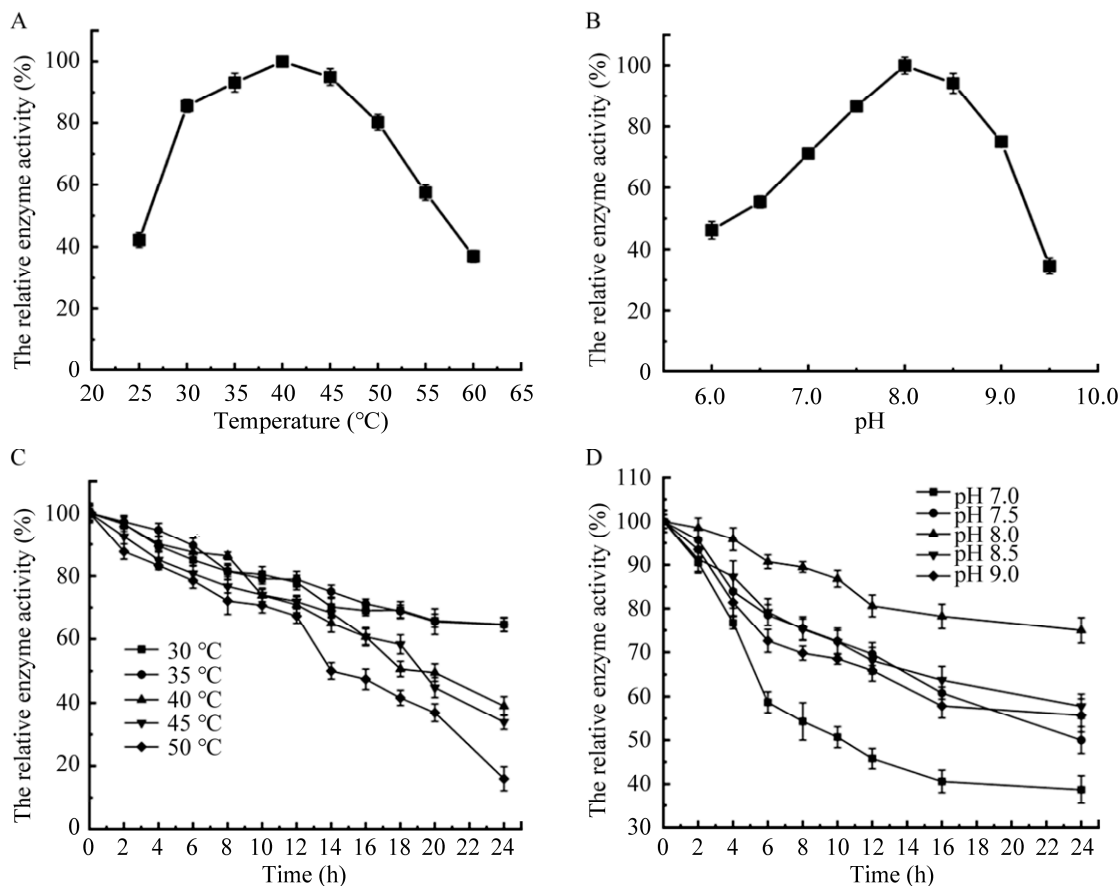


图 6 GshAB 的最适温度(A)、最适 pH (B)、温度稳定性(C)和 pH 稳定性(D)

Figure 6 Enzymatic properties of GshAB. A: The optimum temperature of GshAB. B: The optimum pH of GshAB. C: The temperature stability of GshAB. D: The pH stability of GshAB.

2.6 无细胞催化生产谷胱甘肽

对突变酶 *ChPPK*_{K81H-K103V} 与 GshAB 的酶学性质测定发现, *ChPPK*_{K81H-K103V} 与 GshAB 的最适 pH 均为 8.0, *ChPPK*_{K81H-K103V} 最适温度为 35 °C, 而在最适温度 40 °C 下 GshAB 酶的热稳定差, 所以选择 35 °C 作为 GshAB 酶的反应温度。如图 7A 所示, 由于这 2 种酶的反应温度与反应 pH 保持一致, 选择大肠杆菌(*E. coli*) BL21

作为宿主, 直接串联 GshAB 与 *ChPPK*、GshAB 与 *ChPPK*_{K81H-K103V}, 构建获得菌株 EC02、EC03, EC01 菌株作为对照, 以无细胞裂解液的形式催化谷胱甘肽的生产。为验证突变酶 *ChPPK*_{K81H-K103V} 对 ATP 再生能力的改善效果, 降低催化过程中的成本, 将 GshAB 双功能酶与 *ChPPK*_{K81H-K103V} 偶联生产谷胱甘肽作为 ATP 再生平台的模型(图 7B)。分别将 EC01、EC02、EC03 诱导表达后

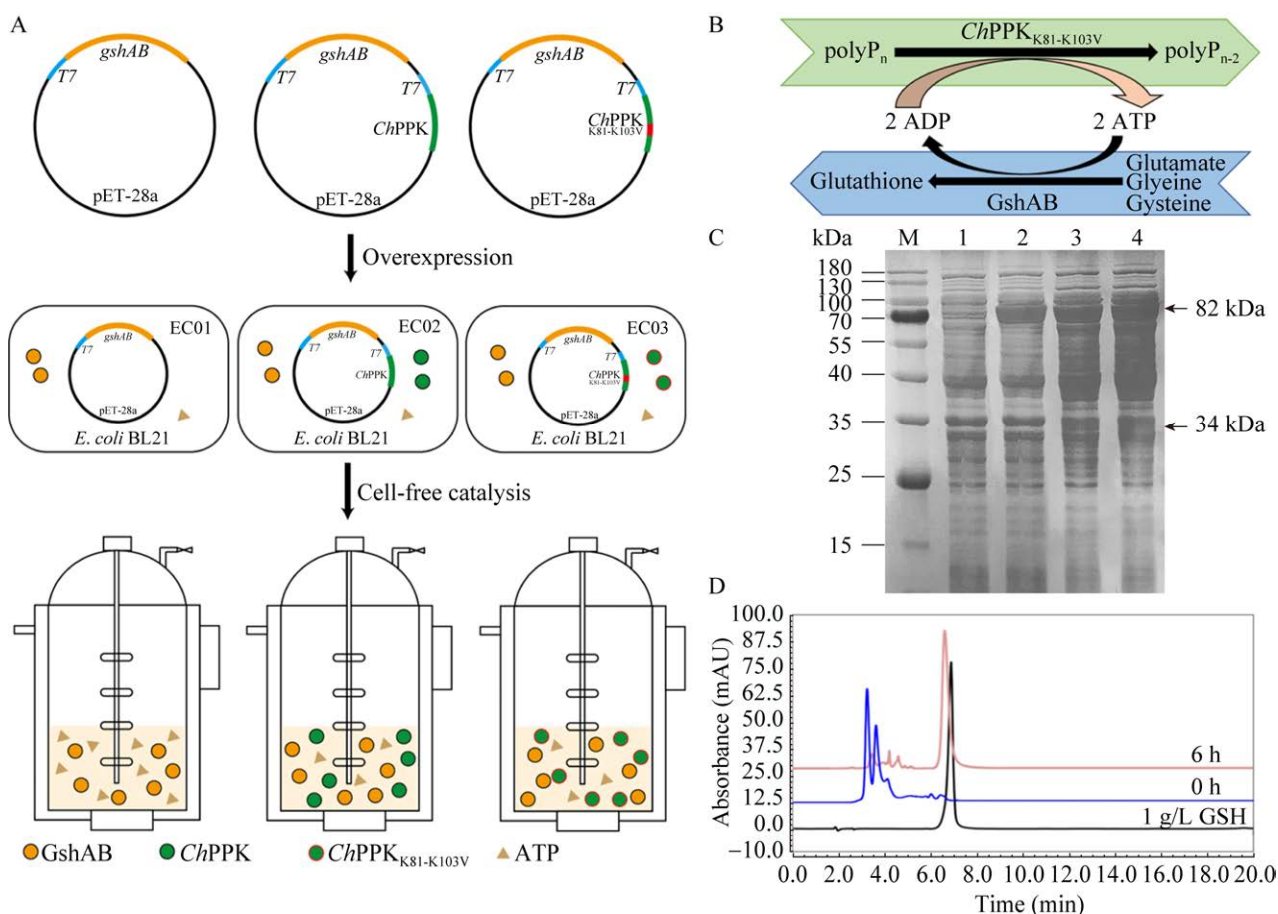


图7 偶联 ATP 再生体系无细胞催化生产谷胱甘肽示意图(A-B)、SDS-PAGE 分析(C)以及反应的高效液相色谱图(D)

Figure 7 Cell-free catalytic production of glutathione with the ATP regeneration system. A: Schematic diagram of cell-free catalysis. B: Construction of the ATP regeneration platform. C: SDS-PAGE analysis of the lysates. M: Protein marker; 1: BL21/pET-28a; 2: BL21/pET-28a-GshAB; 3: BL21/pET-28a-GshAB-*ChPPK*; 4: BL21/pET-28a-GshAB-*ChPPK_{K81H-K103V}*. D: Chromatogram of glutathione.

破细胞,获得的裂解液在发酵罐中直接进行无细胞催化产谷胱甘肽。裂解液的 SDS-PAGE 如图 7C 所示, GshAB、*ChPPK* 与 *ChPPK_{K81H-K103V}* 均成功表达。谷胱甘肽的液相色谱图如图 7D 所示。

如图 8A 所示,催化体系中添加底物谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸和充足的 ATP (100 mmol/L) 时, 37 °C 反应后, EC01 的裂解液 6 h 内可将 50 mmol/L 的底物转化为 (30.7±1.9) mmol/L 的谷胱甘肽,但由于 ATP 的价格昂贵,在实际生产中添加大量的 ATP 是不太可能的,因此,将 *ChPPK* 与 GshAB 偶联,除了额外添加的

5 mmol/L ATP,裂解液中内源性的 ATP 也可进一步启动催化反应,EC02 催化体系 6 h 可生产 (17.9±1.7) mmol/L 的谷胱甘肽。而在突变酶 *ChPPK_{K81H-K103V}* 与 GshAB 偶联的 EC03 催化体系中,6 h 内可将 50 mmol/L 底物转化产生 (25.4±1.9) mmol/L 的谷胱甘肽,可以达到 EC01 无细胞催化体系的 82.7% 的效果,比未突变的 *ChPPK* 与 GshAB 偶联的催化产量提高了 41.9%。突变酶 *ChPPK_{K81H-K103V}* 可以有效地减少底物 ATP 的添加,在该突变酶的驱动下,为谷胱甘肽的生产提供了高效的 ATP 供应,大大节省了反应成本。

2.7 无细胞催化缓冲液的优化

按照 1.2.11 中发酵罐 EC01 和 EC03 无细胞生产谷胱甘肽的体系, 改变催化的缓冲液, 分别放置于 PBS、Tris-HCl、甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 8.0, 100 mmol/L)中, 37 °C 反应, 取样测定谷胱甘肽的产量。结果如图 8B 所示, 6 h 时 EC01 在 PBS、Tris-HCl、甘氨酸-NaOH 缓冲液中谷胱甘肽的产量分别为 (31.5 ± 1.4) mmol/L、 (34.1 ± 2.7) mmol/L、 (27.6 ± 1.1) mmol/L, 而 EC03 在 PBS、Tris-HCl、甘氨酸-NaOH 缓冲液中谷胱甘肽的产量分别为

(24.3 ± 2.1) mmol/L、 (26.8 ± 2.9) mmol/L、 (20.2 ± 2.5) mmol/L。由此可见, 在 Tris-HCl 缓冲液下 EC01、EC03 催化体系中谷胱甘肽的产量最高, 选择 Tris-HCl 缓冲液用于后续实验。

2.8 裂解液菌体量的优化

按照 1.2.12 中发酵罐 EC01 和 EC03 无细胞生产谷胱甘肽的体系, 改变裂解液的菌体量, 分别将 OD_{600} 为 5、10、15、20 的裂解液加入 EC01、EC03 催化体系中, 37 °C 反应, 取样测定谷胱甘肽的产量。结果如图 8C 所示, OD_{600} 为 5、10、

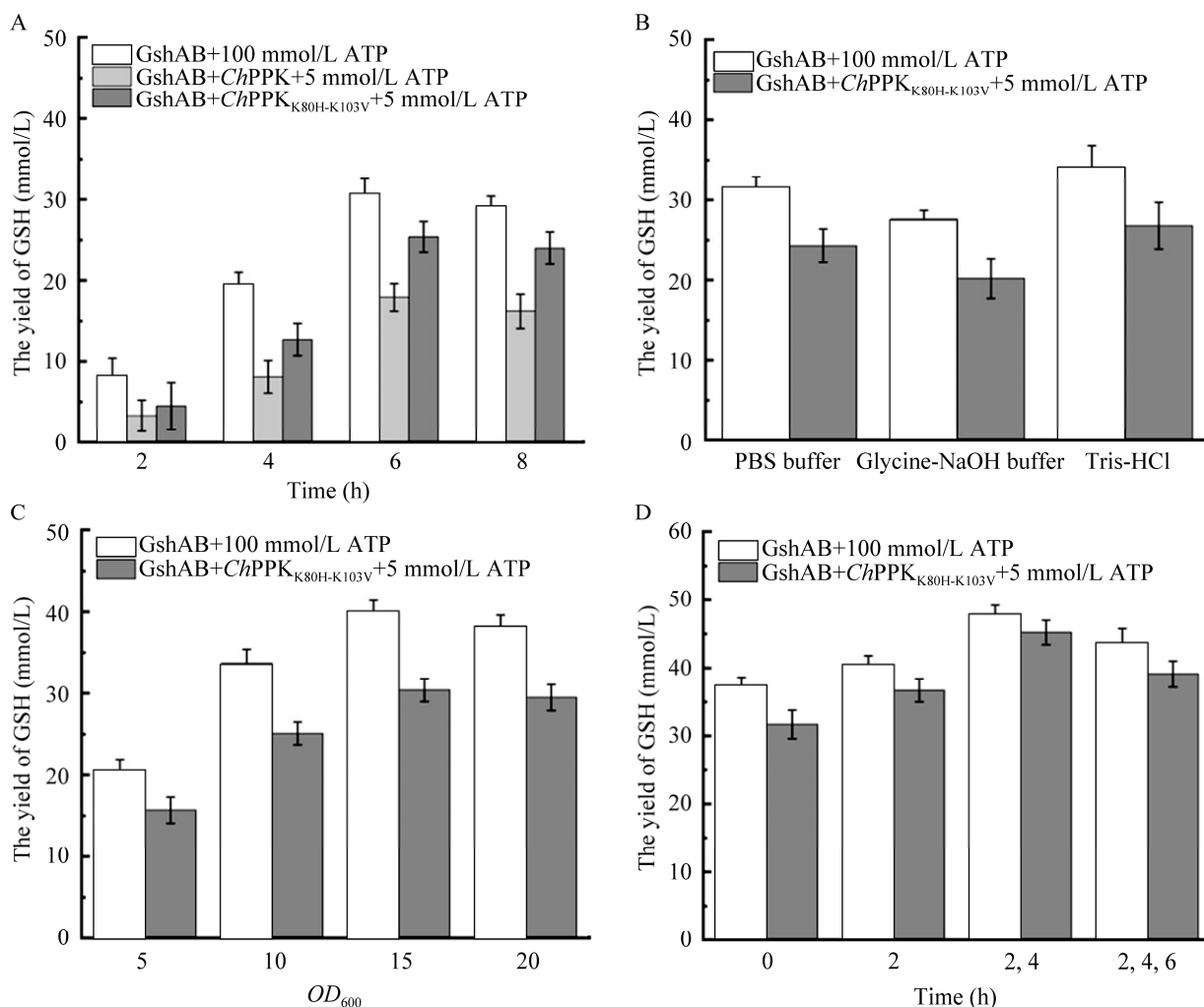


图 8 无细胞催化生产谷胱甘肽以及催化体系的优化

Figure 8 Production of glutathione by the cell-free catalytic systems and optimization of the systems. A: The EC01, EC02, and EC03 systems catalyzed the production of glutathione. B: Optimization of the buffer for cell-free catalytic systems. C: Optimization of bacterial mass in lysate. D: Optimization of the feeding time for cell-free catalytic systems.

15 时, EC01 与 EC03 催化体系中谷胱甘肽产量逐渐增加, 而 OD_{600} 为 20 时, 谷胱甘肽产量不再增加, 当 OD_{600} 为 15 时, EC01 与 EC03 中谷胱甘肽产量最高, 分别为 (39.9 ± 1.5) mmol/L、 (30.4 ± 1.4) mmol/L, 选择 OD_{600} 为 15 用于后续实验。

2.9 无细胞催化补料时间的优化

按照 1.2.13 中发酵罐 EC01 和 EC03 无细胞生产谷胱甘肽的体系, 选择缓冲液 Tris-HCl (pH 8.0, 100 mmol/L)、菌体量 OD_{600} 为 15 的反应条件, 改变底物补料的时间, 将底物分别于不同时间加入到 EC01、EC03 的无细胞催化体系中, 37 °C 反应, 取样测定谷胱甘肽的产量。结果如图 8D 所示, 在 2、4 h 分别加入底物谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸, 6 h 时 EC01 无细胞催化体系中谷胱甘肽产量最高, 为 (47.9 ± 1.3) mmol/L; 而 EC03 无细胞生产谷胱甘肽的体系在缓冲液和菌体量最优的情况下, 2 h 和 4 h 分别加入底物谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸和 polyP₆, 6 h 时 EC03 无细胞催化体系中谷胱甘肽产量为 (45.2 ± 1.8) mmol/L, 底物 L-半胱氨酸的转化率为 90.4%, 与未优化的 EC03 催化体系生产谷胱甘肽产量 (25.4 ± 1.9) mmol/L 相比提高了 1.78 倍; 在 2、4、6 h 加入底物后谷胱甘肽产量并未继续增加, 可能是由于随着时间的增加, 体系中酶的活性逐渐降低, 催化效率因此下降。

3 讨论与结论

本研究通过分子对接和定点突变, 理性设计来扩大多聚磷酸盐激酶的双底物 polyP 和 ADP 通道腔, 提高底物的利用范围和底物的耐受性, 与野生型相比, 双突变酶 ChPPK_{K81H-K103V} 的相对酶活提高至 326.7%。在级联催化或体外生物合成系统中, 除了优先选择低能耗的 ATP 或避免使用 ATP 外, 低成本、高活性、高产量的 ATP

再生系统也是合成生物学的策略之一。因此, 将该 ATP 再生系统运用到谷胱甘肽的生产中, 通过无细胞催化的方式, 内源性的 ATP 可启动再生系统的优点, 避免谷胱甘肽胞内生产过程中细胞屏障和复杂的通路修饰等问题, 快速在体外重构谷胱甘肽的生产通路。EC01 无细胞催化体系中, 添加足量的 ATP, 催化产生 (30.7 ± 1.9) mmol/L 的谷胱甘肽, 而在 EC03 的无细胞催化体系中, 运用 ChPPK_{K81H-K103V} 酶再生 ATP 的能力, 增强 ATP 的可持续供给, 添加 5 mmol/L ATP, 最终 6 h 也可以生产 (25.4 ± 1.9) mmol/L 的谷胱甘肽, 同时比突变前的 EC02 无细胞催化体系, 谷胱甘肽产量提高了 41.9%。对无细胞催化体系的缓冲液、裂解液菌体量、补料时间优化后, EC01 无细胞催化体系可产生 (47.9 ± 1.3) mmol/L 谷胱甘肽, EC03 无细胞体系可产生 (45.2 ± 1.8) mmol/L 谷胱甘肽, 底物 L-半胱氨酸的转化率达到 90.4%。在本研究中, 偶联突变酶 ChPPK_{K81H-K103V} 的催化体系中, 仅添加 5 mmol/L ATP, 即可获得高效的 ATP 再生效率, 添加量远低于 Cao 等^[20]利用 GshAB 与 PPK 纯酶体系生产谷胱甘肽的 ADP 添加量(添加量为 20 mmol/L); 在 EC03 的最优催化体系中, 最终底物 L-半胱氨酸的转化率可达到 90.4%, 高于 Zhang 等^[21]将纯化的 GshAB 酶与 PPK 湿细胞混合得到的 81.4% 转化率。因此, 提高 ChPPK 酶生产 ATP 的能力, 可有效增强底物的转化率, ChPPK_{K81H-K103V} 的再生体系实现了酶催化生产谷胱甘肽的高产量、高转化率和高经济价值的统一。在获得该高效的 PPK 突变酶后, 生物催化反应中添加 ChPPK_{K81H-K103V} 可以显著提高 ATP 再生的效率和可持续性, 对催化体系优化后可提高催化的效率和底物转化率, 节省需能反应的成本。

REFERENCES

- [1] VU HUU K, ZANGL R, HOFFMANN J, JUST A, MORGNER N. Bacterial F-type ATP synthases follow a well-choreographed assembly pathway[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1218.
- [2] FEDORCHUK TP, KHUSNUTDINOVA AN, EVDOKIMOVA E, FLICK R, Di LEO R, STOGIOS P, SAVCHENKO A, YAKUNIN AF. One-pot biocatalytic transformation of adipic acid to 6-aminocaproic acid and 1,6-hexamethylenediamine using carboxylic acid reductases and transaminases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(2): 1038-1048.
- [3] ZHANG YL, GONG SY, WANG X, MUHAMMAD M, LI YY, MENG SS, LI Q, LIU D, ZHANG HD. Insights into the inhibition of *Aeromonas hydrophila* D-alanine-D-alanine ligase by integration of kinetics and structural analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(28): 7509-7519.
- [4] LV QL, HU MK, TIAN LZ, LIU F, WANG Q, XU MJ, RAO ZM. Enhancing L-glutamine production in *Corynebacterium glutamicum* by rational metabolic engineering combined with a two-stage pH control strategy[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125799.
- [5] XIONG ZQ, KONG LH, WANG GQ, XIA YJ, ZHANG H, YIN BX, AI LZ. Functional analysis and heterologous expression of bifunctional glutathione synthetase from *Lactobacillus*[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(8): 6937-6945.
- [6] CHEN YW, TAN TW. Enhanced S-adenosylmethionine production by increasing ATP levels in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(20): 5200-5209.
- [7] SINGH M, TIWARI P, ARORA G, AGARWAL S, KIDWAI S, SINGH R. Establishing virulence associated polyphosphate kinase 2 as a drug target for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26900.
- [8] NOCEK BP, KHUSNUTDINOVA AN, RUSZKOWSKI M, FLICK R, BURDA M, BATYROVA K, BROWN G, MUCHA A, JOACHIMIAK A, BERLICKI Ł, YAKUNIN AF. Structural insights into substrate selectivity and activity of bacterial polyphosphate kinases[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(11): 10746-10760.
- [9] BROWN MRW, KORNBERG A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(46): 16085-16087.
- [10] LINDNER SN, VIDAURRE D, WILLBOLD S, SCHOBERTH SM, WENDISCH VF. NCgl2620 encodes a class II polyphosphate kinase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(15): 5026-5033.
- [11] TAVANTI M, HOSFORD J, LLOYD RC, BROWN MJB. ATP regeneration by a single polyphosphate kinase powers multigram-scale aldehyde synthesis *in vitro*[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(2): 828-837.
- [12] KOBAYASHI J, SASAKI D, HARA KY, HASUNUMA T, KONDO A. Metabolic engineering of the L-serine biosynthetic pathway improves glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 1-10.
- [13] 周文龙, 唐亮, 成凯, 刘恣之, 杨燕, 王伟. CRISPR/Cas9 介导的高产谷胱甘肽原养型酵母工程菌的构建[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(12): 1999-2008.
ZHOU WL, TANG L, CHENG K, LIU LZ, YANG Y, WANG W. Construction of prototrophic glutathione-high-producing yeast strain mediated by CRISPR/Cas9[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(12): 1999-2008 (in Chinese).
- [14] CHEN HL, CAO XT, ZHU NQ, JIANG LH, ZHANG XG, HE QM, WEI PH. A stepwise control strategy for glutathione synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* based on oxidative stress and energy metabolism[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(8): 1-10.
- [15] SCHMACHT M, LORENZ E, STAHL U, SENZ M. Medium optimization based on yeast's elemental composition for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(5): 555-561.
- [16] LIU W, ZHU XC, LIAN JZ, HUANG L, XU ZN. Efficient production of glutathione with multi-pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, 46(12): 1685-1695.
- [17] ZHANG J, QUAN C, WANG C, WU H, LI ZM, YE Q. Systematic manipulation of glutathione metabolism in *Escherichia coli* for improved glutathione production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 38.
- [18] YANG JH, LI W, WANG DZ, WU H, LI ZM, YE Q. Characterization of bifunctional L-glutathione synthetases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and

- Actinobacillus succinogenes* for efficient glutathione biosynthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(14): 6279-6289.
- [19] TANG SM, LIAO DC, LI XW, LIN Y, HAN SY, ZHENG SP. Cell-free biosynthesis system: methodology and perspective of *in vitro* efficient platform for pyruvate biosynthesis and transformation[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(10): 2417-2433.
- [20] CAO H, LI CC, ZHAO J, WANG F, TAN TW, LIU L. Enzymatic production of glutathione coupling with an ATP regeneration system based on polyphosphate kinase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 185(2): 385-395.
- [21] ZHANG X, WU H, HUANG B, LI ZM, YE Q. One-pot synthesis of glutathione by a two-enzyme cascade using a thermophilic ATP regeneration system[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 241: 163-169.
- [22] ZHU YB, LIANG MF, LI HB, NI H, LI LJ, LI, QB, JIANG ZD. A mutant of *Pseudoalteromonas carrageenovora* arylsulfatase with enhanced enzyme activity and its potential application in improvement of the agar quality[J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126652.
- [23] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [24] CUI CX, MING H, LI LJ, LI MJ, GAO J, HAN T, WANG YY. Fabrication of an *in-situ* co-immobilized enzyme in mesoporous silica for synthesizing GSH with ATP regeneration[J]. Molecular Catalysis, 2020, 486: 110870.
- [25] 陈佳杰, 徐美娟, 杨套伟, 张显, 邵明龙, 李华钟, 饶志明. 亮氨酸脱氢酶 C 端 Loop 区域的理性设计及多酶级联高效合成 L-2-氨基丁酸[J]. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4254-4265.
- CHEN JJ, XU MJ, YANG TW, ZHANG X, SHAO ML, LI HZ, RAO ZM. Rational design of the C-terminal loop region of leucine dehydrogenase and cascade biosynthesis L-2-aminobutyric acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(12): 4254-4265 (in Chinese).
- [26] ZONG ZY, HE RL, FU HH, ZHAO TF, CHEN SL, SHAO XG, ZHANG DY, CAI WS. Pretreating cellulases with hydrophobins for improving bioconversion of cellulose: an experimental and computational study[J]. Green Chemistry, 2016, 18(24): 6666-6674.
- [27] 柴宝成, 姜钰琳, 倪晔, 韩瑞枝. 环糊精葡萄糖基转移酶 182 位点定点改造催化合成糖基化染料木素[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 749-759.
- CHAI BC, JIANG YL, NI Y, HAN RZ. Engineering the 182 site of cyclodextrin glucosyltransferase for glycosylated genistein synthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 749-759 (in Chinese).
- [28] GOTTSCHALK J, ABMANN M, KUBALLA J, ELLING L. Repetitive synthesis of high-molecular-weight hyaluronic acid with immobilized enzyme cascades[J]. ChemSusChem, 2022, 15(9): e202101071.
- [29] ZHOU JP, ZHANG RZ, YANG TW, LIU QL, ZHENG JX, WANG F, LIU F, XU MJ, ZHANG X, RAO ZM. Relieving allosteric inhibition by designing active inclusion bodies and coating of the inclusion bodies with Fe₃O₄ nanomaterials for sustainable 2-oxobutyric acid production[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(9): 8889-8901.

(本文责编 郝丽芳)