

研究报告

祖先羧基还原酶的挖掘及酶法合成(S)-乙偶姻的研究

王嘉乐¹, 奚安¹, 安彤¹, 郑香玉², 吴达¹, 束茹欣^{*1}, 许国超^{*1,2}¹ 上海烟草集团有限责任公司, 上海 200082² 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

王嘉乐, 奚安, 安彤, 郑香玉, 吴达, 束茹欣, 许国超. 祖先羧基还原酶的挖掘及酶法合成(S)-乙偶姻的研究[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1512-1521.

WANG Jiale, XI An, AN Tong, ZHENG Xiangyu, WU Da, SHU Ruxin, XU Guochao. An ancestral carbonyl reductase: mining and application in the synthesis of (S)-acetoin[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1512-1521.

摘要:【背景】(S)-乙偶姻是一种重要的精细化学品, 开展其绿色高效合成具有重要的应用价值。

【目的】祖先酶可能具有较好的热稳定性。论文以筛选高活性和稳定性的祖先羧基还原酶为目标, 并探究其酶学性质, 实现(S)-乙偶姻的高效酶法合成。【方法】基于祖先序列重建法的基因挖掘策略筛选双乙酰还原酶, 并对其进行了酶学性质表征, 构建不对称还原双乙酰合成(S)-乙偶姻的反应体系。【结果】获得了一种可以不对称还原双乙酰合成(S)-乙偶姻的祖先羧基还原酶 AncBDH1, 并在 *Escherichia coli* 中实现可溶性表达。序列保守性分析显示, AncBDH1 含有短链醇脱氢酶家族的特征基序, 且与已报道羧基还原酶的同源性均较低。对 AncBDH1 进行了镍柱纯化和酶学性质表征, 显示其仅可利用 NADH 为辅酶, 最适反应 pH 值为 7.0, 最适反应温度为 60 °C, 催化活性不依赖金属离子, 并且表现出对二甲基亚砷等有机溶剂的良好耐受性。AncBDH1 可以在 12 h 内将 200 mmol/L 双乙酰完全转化为(S)-乙偶姻。【结论】发现了一个具有最高的最适温度及有机溶剂耐受性的祖先羧基还原酶 AncBDH1, 并实现了(S)-乙偶姻的高效酶法合成, 为(S)-乙偶姻的酶法合成奠定了一定的研究基础。

关键词: 祖先序列重建; 基因挖掘; 羧基还原酶; (S)-乙偶姻

*Corresponding authors. E-mail: SHU Ruxin, shurx@sh.tobacco.com.cn; XU Guochao, guochaouxu@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-11-07; Accepted: 2024-01-09; Published online: 2024-02-23

An ancestral carbonyl reductase: mining and application in the synthesis of (S)-acetoin

WANG Jiale¹, XI An¹, AN Tong¹, ZHENG Xiangyu², WU Da¹, SHU Ruxin^{*1}, XU Guochao^{*1,2}

¹ Shanghai Tobacco Group Limited Company, Shanghai 200082, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] (S)-Acetoin is a class of important fine chemicals with wide applications. Efficient and sustainable synthesis of (S)-acetoin is of special interest. [Objective] Due to the high thermostability, ancestral carbonyl reductases are promising in industrial biocatalysis. This study aims to mine an ancestral carbonyl reductase with high activity and thermostability, characterize its enzymatic properties, and establish an efficient enzymatic catalysis system for the synthesis of (S)-acetoin. [Methods] The gene mining strategy based on ancestral sequence reconstruction was adopted to identify ancestral carbonyl reductases. The enzyme properties were characterized, and the purified ancestral carbonyl reductase was used for the establishment of the (S)-acetoin synthesis system. [Results] An ancestral carbonyl reductase AncBDH1 was identified and heterogeneously expressed in *Escherichia coli* in the soluble form, and it displayed a high activity in the asymmetric reduction of diethyl into (S)-acetoin. The sequence of AncBDH1 contained the conserved motifs of short-chain dehydrogenase/reductase superfamily and exhibited low similarity with the sequences of other reported carbonyl reductases. AncBDH1 was purified by nickel-affinity chromatography for enzyme characterization. It displayed high dependence on NADH instead of NADPH as a cofactor, with the optimum performance at pH 7.0 and 60 °C. The activity of AncBDH1 was not dependent on metal ions and AncBDH1 could tolerate organic solvents such as dimethyl sulfoxide. AncBDH1 completely reduced 200 mmol/L diethyl into (S)-acetoin within 12 h. [Conclusion] This study provides a novel ancestral carbonyl reductase AncBDH1 with tolerance to high temperature and organic solvents and capable of catalyzing the synthesis of (S)-acetoin, laying a certain research foundation for the biocatalytic synthesis of (S)-acetoin.

Keywords: ancestral sequence reconstruction; gene mining; carbonyl reductase; (S)-acetoin

(S)-乙偶姻是一种具有特殊奶油香气的食用香料, 广泛应用于食品、烟草、酒类和化妆品行业^[1-2]。此外, (S)-乙偶姻也可以作为手性中间体, 用于手性药物的合成^[3]。目前, (S)-乙偶姻的生物合成方法主要包括水解酶立体选择性拆分外消旋乙偶姻和羰基还原酶不对称还原双乙酰^[4]。尽管水解酶拆分路线具备较高的效率, 但是存在 50%理论最大收率的瓶颈, 而由羰基还原酶催化的双乙酰不对称还原反应具有

100%理论最大收率, 具有较大的应用潜力^[5]。然而, 现有的羰基还原酶存在稳定性低及立体选择性和区域选择性不佳的问题, 容易将合成的(S)-乙偶姻进一步还原得到 2,3-丁二醇^[5]。因此, 开发具有较高稳定性和选择性的羰基还原酶具有重要的研究意义。

酶祖先序列重建(ancestral sequence reconstruction, ASR)是指通过计算推导来自灭绝生物酶氨基酸序列的技术^[6], 由于已灭绝的

生物处于进化的早期,且往往生存于极端环境,因此祖先酶可能具有较高的热稳定性^[7]、催化活性^[8]、催化混杂性^[9]等。基于祖先序列的基因挖掘策略已逐渐成为一种获得具有高稳定性和宽底物谱特性酶的有效方法,并用于单加氧酶、内酯水解酶、羧腈裂解酶和醇脱氢酶等的基因挖掘^[7-9]。2018年,Gumulya等^[10]通过ASR技术获得了能够承受高温和长时间反应的P450酶和酮醇酸还原异构酶,与现存的大肠杆菌来源的酮醇酸还原异构酶相比,祖先酶的比活力提高了8倍,热稳定性也更好。目前,已经开发出了多种祖先序列重建的软件和方法,如MEGA X (<https://www.megasoftware.net>)、FastML (<https://fastml.tau.ac.il>)和FireProt (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotasr/>)等,可以实现祖先序列的自动重建。尽管祖先酶具有显著的优势,但是祖先酶的可溶性表达水平不如当代酶,且多数祖先酶往往活力较低^[11]。为了解决上述问题,本研究团队提出了定向挖掘祖先酶的策略,通过基于当代酶比对筛选确定有活性的进化分支,从进化分支中找到具有较高可溶性和活性祖先酶的概率较高。通过该方法成功筛选获得了具有较高热稳定性和宽泛底物特异性的醇脱氢酶A64,其在50℃的半衰期比当代酶高352倍^[12]。

本研究采用祖先序列重建的策略设计5个祖先羧基还原酶,并在大肠杆菌中进行异源表达。功能筛选发现,AncBDH1对双乙酰具有最高的催化活性和选择性。为更好地了解AncBDH1的性能特征,本研究对其进行纯化,表征最适pH、最适温度、金属离子依赖性、有机溶剂耐受性和底物特异性等酶学性质,并考察AncBDH1在生物催化合成(S)-乙偶姻的效果。本研究将为(S)-乙偶姻的生物合成提供高效的生物催化剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒、基因

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和pET28a 质粒为本实验室保藏;祖先酶基因由天霖生物科技(上海)有限公司合成。

1.1.2 培养基

LB培养基(g/L):酵母提取物 5.0,胰蛋白胨 10.0,氯化钠 10.0,121℃灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

氯化胆碱、尿素、丙酮、双乙酰、苯乙酮、2-丁酮、2,3-戊二酮、2,4-戊二酮、2,3-己二酮、2,5-己二酮和2,4-己二酮均购自上海毕得医药科技有限公司;T4 DNA连接酶、PrimeSTAR高保真酶、限制性内切酶(*Nde* I、*Bam*H I),宝生物工程(大连)有限公司;NAD(P)H和NAD(P)⁺,邦泰生物工程(深圳)有限公司;IPTG、卡那霉素、氨苄青霉素,生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR仪和蛋白电泳仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;气相色谱仪,岛津仪器(苏州)有限公司;超声波破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 祖先羧基还原酶序列的构建

首先选择*Arthrobacter* sp. TS-15的羧基还原酶PseDH的氨基酸序列(GenBank登录号为WP_142940122.1)^[13],在NCBI数据库中进行BLAST,从中选取相似性>40%的110条序列进行多序列比对和进化树分析。通过FireProt在线工具进行祖先序列重建,并从靠近PseDH所在分支选择5条祖先羧基还原酶序列。所选序列交由天霖生物科技(上海)有限公司合成并亚克隆至pET28a质粒的*Nde* I和*Bam*H I之间,构建重组质粒pET28-*ancbdh1*-5,将重组质粒转化至

Escherichia coli BL21(DE3)菌株中。

1.2.2 引物及 PCR 扩增方法

本实验所用引物为 F (5'-aaaaggagcgatttcatATGATCCGTGTAGAAGGTAAAATTGC-3', 下划线为 *Nde* I 的酶切位点)和 R (5'-gagctcgactctagaggatccTCAGTTGACCAATGCGGG-3', 下划线为 *Bam*H I 的酶切位点)。以合成的质粒为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 上、下游引物(20 μ mol/L)各 2 μ L, 质粒模板(10 ng/ μ L) 1 μ L, 10 \times PrimeSTAR 缓冲液(Mg²⁺ plus) 5 μ L, dNTPs (25 mmol/L) 4 μ L, PrimeSTAR 高保真酶 1 μ L, ddH₂O 35 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 96 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.3 粗酶液的制备

将 1.2.1 中构建的菌种接种至 30 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养, 待 *OD*₆₀₀ 达 0.6 时加入 30 μ L IPTG 诱导(母液浓度为 100 mmol/L), 于 30 $^{\circ}$ C 继续诱导培养 8 h。4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 5 min, 倒掉发酵液上清, 向菌体中加入生理盐水洗涤 1 次, 再加入 10 mL 磷酸钠盐缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0), 使用超声波破碎仪破碎细胞(功率 285 W, 工作 1 s, 间歇 3 s, 共 10 min), 将破碎液在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min, 所得上清即为粗酶液。可用于蛋白纯化、酶活力测定及生物转化。

1.2.4 酶活力测定及酶学性质表征

将包括 0.5 mmol/L NADH 和 NADPH、1 mmol/L 双乙酰、100 mmol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液的 200 μ L 测活体系充分混匀, 30 $^{\circ}$ C 保温 2 min, 加入 10 μ L 酶液(约为 1 mg/mL), 检测 340 nm 下光吸收值的变化。酶活力单位(U)定义为: 在上述条件下, 每分钟催化氧化 1 μ mol NAD(P)H 所需要的酶量。蛋白质含量测定采用 Bradford 法, 以小牛血清白蛋白 BSA 为标准品。酶活力的计算公式参考醇脱氢酶 *KpADH*^[14]。

采用上述酶活力测定方法, 考察在不同 pH 缓冲体系中 *AncBDH1* 活力的变化, 所采用的缓冲体系包括柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0–6.0)、磷酸钠缓冲液(pH 6.0–8.0)、甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH 8.0–10.0); 将活力测定体系分别保温于 25–75 $^{\circ}$ C, 考察反应温度对 *AncBDH1* 活力的影响; 向反应体系中添加 1 mmol/L 的 Mg²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺ 和 EDTA, 考察金属离子对 *AncBDH1* 活力的影响; 向反应体系中添加 5% (体积比)的曲拉通 X-100、十二烷基硫酸钠、吐温 80、二硫苏糖醇、巯基乙醇、甲醇、乙醇、二甲基亚砷、四氢呋喃等, 考察有机溶剂对 *AncBDH1* 酶活力的影响。

1.2.5 双乙酰及乙偶姻的检测方法

通过岛津气相 GC2014 进行底物和产物的分析, 色谱柱为 CP7502-Chirasil-DEX CB, 进样口和检测器温度为 280 $^{\circ}$ C, 柱温设置为 50 $^{\circ}$ C 保温 2 min, 以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 180 $^{\circ}$ C 保温 2 min, 进样量为 1 μ L, 分流比为 50。双乙酰的保留时间为 4.1 min, (R)-乙偶姻保留时间为 8.1 min, (S)-乙偶姻的保留时间为 8.9 min^[15]。

1.2.6 祖先羧基还原酶 *AncBDH1* 不对称还原双乙酰合成(S)-乙偶姻

将 0.5 g 诱导后的重组菌 *E. coli* BL21/pET28-*ancbdh1* 充分重悬于 9.5 mL 磷酸钠缓冲液中(100 mmol/L, pH 7.0), 超声破碎获得破碎液。向破碎液中加入 50 mg 来源于巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 的葡萄糖脱氢酶 *BmGDH* (实验室自行制备)^[16], 0.8 g 葡萄糖, 10 μ L 100 mmol/L NAD⁺, 0.172 g 双乙酰(溶解于 0.5 mL 乙醇), 总体积为 10 mL。将上述体系于 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下振荡反应, 反应过程中用 1 mol/L NaOH 滴定控制反应 pH 值为 7.0。每隔一段时间取样 50 μ L, 加入 450 μ L 去离子水和 500 μ L 乙酸乙酯萃取, 取上层有机相经无水硫酸钠干燥, 进行 GC 分析。

2 结果与分析

2.1 祖先羧基还原酶的挖掘

鉴于来源于 *Arthrobacter* sp. TS-15 的羧基还原酶 PseDH 具有区域选择性还原 1-苯基-1,2-丙二酮为(*S*)-1-羟基-1-苯基-2-丙酮的能力, 其对映体过量值(enantiomeric excess, e.e. 值)为>99%^[13]。尽管尚无关于 PseDH 对双乙酰底物的报道, 但其对多种双酮底物均表现出一定的催化能力, 且仅还原其中一个羧基, 因而是通过不对称还原双乙酰合成(*S*)-乙偶姻的优良出发酶。然而, PseDH 的热稳定性较差, 仅在 15–25 °C 具备较高的稳定性, 在温度超过 30 °C 即发生快速失活, 而在 40 °C 时 PseDH 的半衰期仅为 0.78 h^[13], 这极大限制了 PseDH 在合成手性(*S*)-乙偶姻中的应用。由于祖先羧基还原酶具有较高的稳定性, 在工业生物合成中具有更好的应用开发潜力。因此, 本研究以 PseDH 为对象去筛选还原双乙酰合成(*S*)-乙偶姻的祖先羧基还原酶, 筛选具有较高活性和稳定性的祖先酶。

通过软件预测, 选择其中 5 个祖先羧基还原酶, 编号为 AncBDH1–AncBDH5, AncBDH1 与 AncBDH2–5 之间的序列相似性在 73.0%–93.8%, 氨基酸长度为 272–274 aa, 蛋白质的分子量为 28.6–29.2 kDa (表 1)。经测定, 5 个祖先羧基还原酶对双乙酰均具备催化活性, 其中 AncBDH1 的活力最高, 为 3.2 U/mg, 并且产物为(*S*)-乙

偶姻, e.e. 值为>99%。AncBDH4 与 AncBDH1 的序列相似性为 93.8%, 对双乙酰的比活力为 1.2 U/mg。AncBDH3 对双乙酰的比活力最低, 仅为 0.3 U/mg, e.e. 值为 72% (*S*)。鉴于 AncBDH1 具有最高的催化活力和对映选择性, 因此选择其为进一步的研究对象。

序列分析显示, AncBDH1 的长度为 274 aa, 含有短链醇脱氢酶家族的保守基序, 如包含 N 端参与 NADH 识别和结合的 Rossmann 折叠结构域、富含 loop 区的底物结合结构域和非保守的 C 端。多序列比对显示, AncBDH1 与其余 4 个祖先羧基还原酶具有相对保守的二级结构域(图 1), 均含有 TGXXXGXG (X 代表任意一种氨基酸)序列, 催化四联体 Asn119-Ser141-Tyr155-Lys159。进一步比较 AncBDH1 与已报道酶的序列同源性, 发现其与探针酶 PseDH 的序列相似性为 69.7%, 且具有相同的催化残基, 较高的序列相似性证明 AncBDH1 具有与 PseDH 相似的催化性能。AncBDH1 还含有 30.3% 与 PseDH 不同的催化残基, 这也表明 AncBDH1 具有不同的催化性能。除此之外, 相似性最高的酶为来自 *Bacillus* sp. SG-1 的 3-羧基酰基载体蛋白还原酶 FabG (3-oxoacyl-ACP reductase, 登录号为 WP_006837618.1), 相似性为 39.3%。因此, 本研究发现的 AncBDH1 具有较高的序列新颖性。

2.2 祖先羧基还原酶 AncBDH1 的蛋白纯化 为研究祖先羧基还原酶 AncBDH1 的酶学

表 1 祖先羧基还原酶的筛选结果

Table 1 Screening result of ancestral carbonyl reductases

祖先酶	相似性	氨基酸长度	蛋白分子量	比活力	对映体过量值
Ancestral enzyme	Identity (%)	Protein length in amino acids (aa)	Protein molecular weight (kDa)	Specific activity (U/mg)	Enantiomeric excess (e.e., %)
AncBDH1	100.0	274	28.6	3.2	>99
AncBDH2	82.1	273	29.2	0.5	>99
AncBDH3	73.0	274	28.8	0.3	72
AncBDH4	93.8	274	29.0	1.2	>99
AncBDH5	89.3	272	28.8	0.7	>99

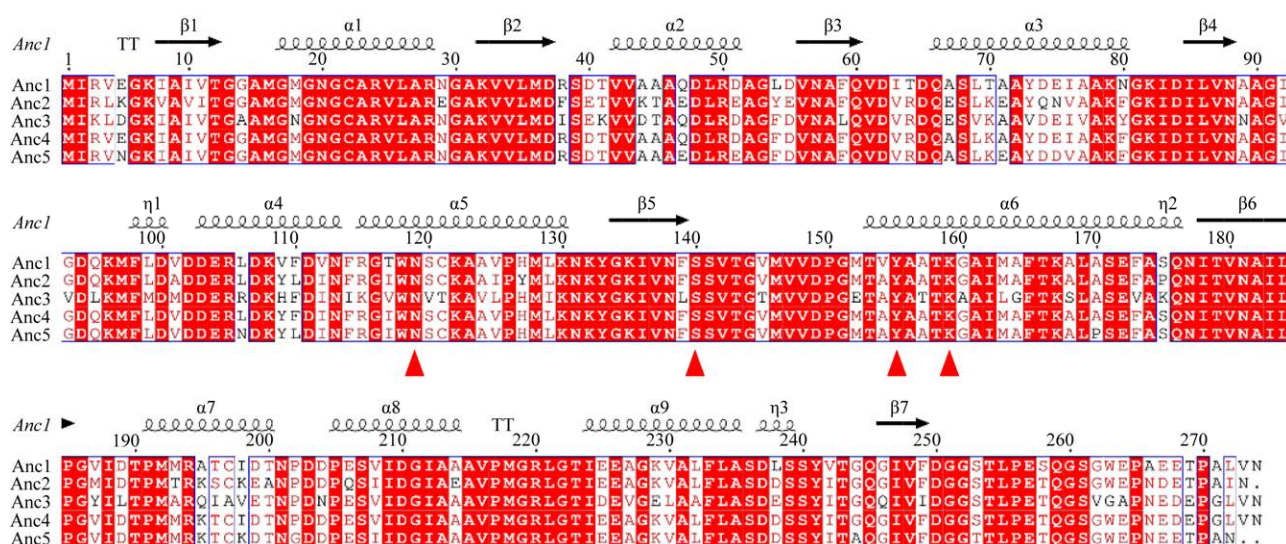


图1 祖先羧基还原酶的多序列比对图 三角形示意催化四联体 Asn119-Ser141-Tyr155-Lys159

Figure 1 Multiple sequence alignment of ancestral carbonyl reductases. Triangle represents the catalytic tetrad, Asn119-Ser141-Tyr155-Lys159.

性质,对重组 AncBDH1 进行镍柱纯化和脱盐处理,最终得到浓度为 1.0 mg/mL 的纯酶。对粗酶和纯酶进行 SDS-PAGE 分析发现, AncBDH1 纯酶仅有一条带(图 2),且分子量约为 31.0 kDa,与理论大小 28.6 kDa 基本相符(2.4 kDa 分子量为载体引入)。AncBDH1 纯酶对双乙酰的比活力为 8.5 U/mg,是粗酶的 2.65 倍。辅因子依赖性测定显示, AncBDH1 仅可在 NADH 存在下具有催化活力,不能以 NADPH 为辅因子,与探针酶 PseDH 具有相同的辅因子依赖性。尽管 PseDH 对双乙酰的活力未知,但其对双乙酰类似底物 1-苯基-1,3-丙二酮的比活力为 55.5 U/mg^[13]。由于自然压力进化的作用,祖先酶经进化为当代酶后催化多样性往往会降低、催化效率会提升,因此 AncBDH1 的催化效率会略低于探针酶 PseDH,然而其可能具备较高稳定性。因此,本研究进一步考察祖先羧基还原酶 AncBDH1 的最适温度及稳定性。

2.3 催化反应的 pH 和温度对 AncBDH1 催化活力的影响

缓冲液的 pH 会通过影响氨基酸的电离,

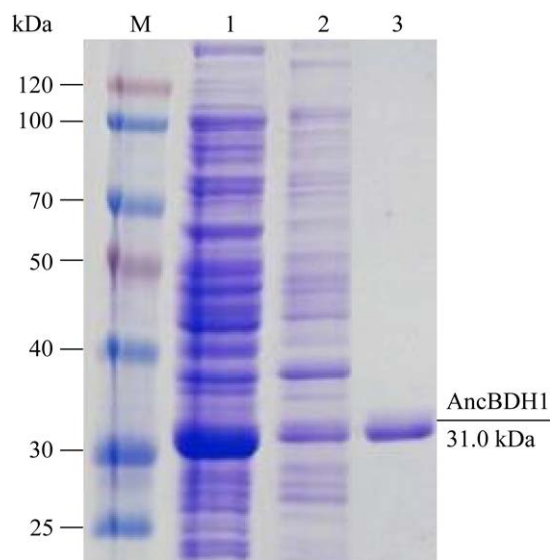


图2 祖先羧基还原酶 AncBDH1 的表达效果及纯酶蛋白电泳图 M: 蛋白分子量标准; 1: AncBDH1 破碎上清; 2: AncBDH1 破碎沉淀; 3: AncBDH1 纯酶

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the expression level and purified ancestral AncBDH1. M: Protein molecular weight marker; 1: Supernatant of AncBDH1; 2: Precipitant of AncBDH1; 3: Purified AncBDH1.

从而影响蛋白质的空间构象和催化活性。测定在不同缓冲液[柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0–6.0), 磷酸钠缓冲液(pH 6.0–8.0), 甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH 8.0–10.0)]中 AncBDH1 的催化活力, 结果见图 3A。AncBDH1 的最适反应 pH 值为 7.0, 当 pH 值低于 7.0 时, 催化活力会快速下降, pH 6.0 时其相对活力仅有 69%, 进一步降低 pH 值至 5.0, 相对活力降低至 18%。当 pH 值高于 7.0 时, 催化活力也呈下降趋势, 但是下降速度较酸性条件下缓和。在 pH 8.0 时其相对活力为 80%, 进一步增加 pH 值至 10.0, 其相对活力为 38%。探针酶 PseDH 的最适反应 pH 值为 6.5^[13], 与其相比 AncBDH1 的最适 pH 更靠近生理条件。在 pH 8.0–10.0 时, PseDH 仅保留有微弱的活力, 因此 AncBDH1 具备更宽的 pH 范围, 这也与 *KpADH* 的祖先醇脱氢酶 A64 类似^[12]。鉴于该酶的最佳反应 pH 值为 7.0, 因此后续采用 pH 7.0 为最佳反应 pH。

温度会通过影响蛋白的构象和底物的传质速率影响酶催化的效率。因此, 考察 25–75 °C 下 AncBDH1 的活性变化情况, 结果如图 3B 所示。AncBDH1 在 60 °C 时表现出最高的催化活力。当温度超过 60 °C 时, 相对活力快速下降, 在 70 °C 时其相对活力仅为 12%。当温度低于

60 °C 时, 其活力下降较为缓慢, 在 50 °C 时仍保留有 93% 的相对活力, 30 °C 时相对活力为 50%。探针酶 PseDH 的最适温度仅为 35 °C^[13], 因此 AncBDH1 的最适温度比 PseDH 的最适温度高 25 °C。以上证明, AncBDH1 具有更高的抵抗高温的能力, 这也跟 AncBDH1 特殊的祖先序列存在相关性。

2.4 金属离子和有机溶剂对 AncBDH1 催化活力的影响

少数的短链醇脱氢酶家族的羰基还原酶需要依赖二价金属离子, 如 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} , 这主要是因为二价金属离子会参与活性中心结构的维持或通过底物结合, 从而影响羰基还原酶的催化活力。因此, 考察不同二价金属离子和乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)等对 AncBDH1 催化活力的影响。实验中, 以不添加金属离子所测得的酶活力为 100% 对照, 结果见图 4A。未发现可以显著激活 AncBDH1 的金属离子, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 可轻微提高其催化活力, 相对活力分别为 105%、107% 和 109%。添加金属离子 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 可显著降低其催化活力, 相对活力分别为 13% 和 10%。但是, 添加 EDTA 时, AncBDH1 的相对活力为 96%。因此, 证明该 AncBDH1 不依赖金属离子。

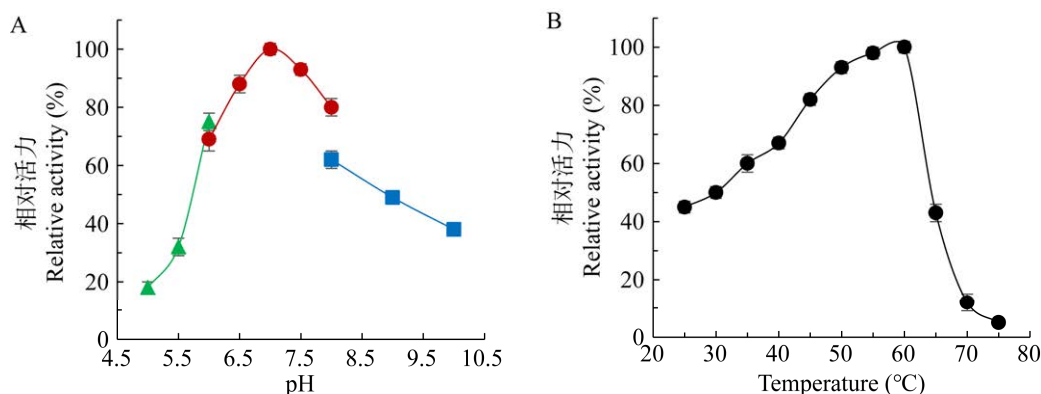


图 3 pH (A)和温度(B)对祖先羰基还原酶 AncBDH1 催化活力的影响

Figure 3 Influence of pH (A) and temperature (B) on the catalytic activity of AncBDH1.

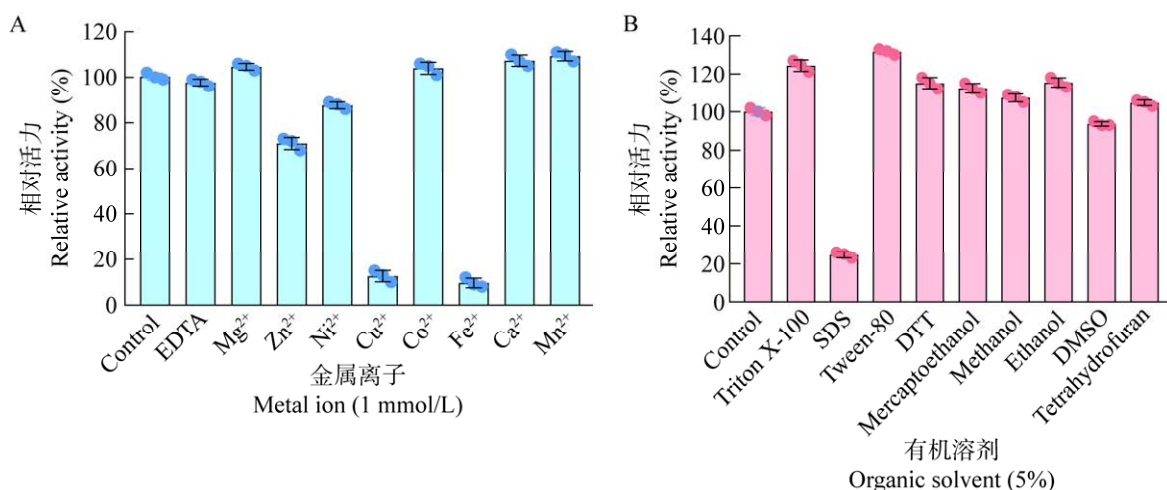


图 4 金属离子(A)和有机溶剂(B)对祖先羰基还原酶 AncBDH1 催化活力的影响

Figure 4 Influence of metal ions (A) and organic solvent (B) on the catalytic activity of ancestral carbonyl reductase AncBDH1.

进一步考察十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)等添加剂和有机溶剂等对 AncBDH1 催化活力的影响, 结果如图 4B 所示。表面活性剂 Triton X-100 和 Tween-80 可以提高 AncBDH1 的催化活力, 相对活力分别为 124%和 132%, 说明表面活性剂的存在有利于底物的分散和蛋白构象的稳定。添加 DTT 和巯基乙醇也可以轻微提高 AncBDH1 的催化活力, 相对活力分别为 115%和 112%。SDS 的加入可以显著降低 AncBDH1 的催化活力, 相对活力为 25%。因此, 在 AncBDH1 制备的过程中要尽量避免 SDS。有机溶剂甲醇、乙醇、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)和四氢呋喃对 AncBDH1 的活力影响较少, 相对活力分别为 107%、115%、94%和 105%。尤其是发现祖先羰基还原酶对高极性 DMSO 表现出较高的耐受性, 在含有 5% DMSO 存在条件下, 仍然表现出 94%的相对活力, 证明 AncBDH1 具有较好的溶剂稳定性。

2.5 祖先羰基还原酶 AncBDH1 的底物特异性

为研究 AncBDH1 不对称还原多种前手性

酮的能力, 对其底物特异性进行考察。选取多种烷基酮、芳香酮、烷基二酮类的底物, 结果见表 2。结果表明, AncBDH1 对测试的 9 种底物均具有催化活力, 尤其是对底物丙酮的比活力达 13.3 U/mg, 对苯乙酮的比活力为 1.2 U/mg, 具备较好的催化活力。AncBDH1 对多种二酮底物均表现出的一定的催化能力, 如对 2,3-戊二酮和 2,4-戊二酮的比活力分别达到 6.5 U/mg 和 3.2 U/mg。对己二酮底物也表现出较高的催化能力, 如对 2,3-己二酮的比活力为 4.4 U/mg, 对 2,5-己二酮和 3,4-己二酮的比活力分别为 2.1 U/mg 和 0.9 U/mg。由此可见, AncBDH1 具有相对较广的底物谱, 可以对多种烷基酮、芳香酮和烷基二酮类底物具有较高的催化效果, 尤其是对含有 ω -1 位羰基的底物。

2.6 应用祖先羰基还原酶 AncBDH1 合成 (S)-乙偶姻

为验证祖先羰基还原酶 AncBDH1 的应用范围, 实现 AncBDH1 在(S)-乙偶姻合成中的应用。首先考察利用酶法不对称还原双乙酰底物合成(S)-乙偶姻中的应用效果(图 5)。为降低辅

表 2 祖先羧基还原酶 AncBDH1 的底物谱

Table 2 Substrate spectrum analysis of ancestral carbonyl reductase AncBDH1

底物 Substrate	结构 Formula	比活力 Specific activity (U/mg)
丙酮 Acetone		13.3±0.5
苯乙酮 Acetophenone		1.2±0.2
双乙酰 Biacetyl		8.5±0.4
2-丁酮 Butan-2-one		4.5±0.3
2,3-戊二酮 Pentane-2,3-dione		6.5±0.3
2,4-戊二酮 Pentane-2,4-dione		3.2±0.2
2,3-己二酮 Hexane-2,3-dione		4.4±0.3
2,5-己二酮 Hexane-2,5-dione		2.1±0.2
3,4-己二酮 Hexane-3,4-dione		0.9±0.2

酶的成本, 提高反应的经济性, 实验引入来自巨大芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶进行辅酶再生^[17]。结果发现, 当底物浓度为 200 mmol/L 时, AncBDH1 可以快速将双乙酰底物转化为(S)-乙偶姻。对反应的过程进行跟踪, 发现在反应 8 h 时转化率即达到 96.8%, 进一步延长反应时间到 12 h, 转化率达到 99.9%。此时, 产物的手性测试显示产物为(S)-乙偶姻, 且 e.e. 值为>99.9%, 反应过程中未发现 2,3-丁二醇的生成。上述结果表明, AncBDH1 是一个出色的生物催化剂, 可以用于不对称还原双乙酰合成(S)-乙偶姻。

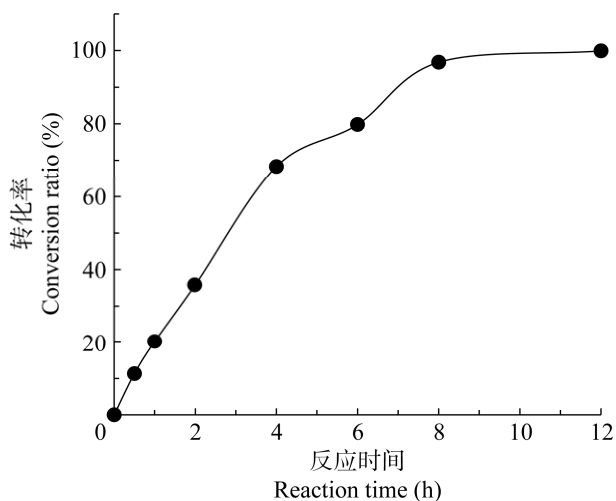


图 5 利用祖先羧基还原酶 AncBDH1 不对称还原双乙酰合成(S)-乙偶姻

Figure 5 Asymmetric reduction of diethyl into (S)-acetoin employing ancestral carbonyl reductase AncBDH1.

3 讨论与结论

采用祖先序列重建的策略, 筛选获得了一种祖先羧基还原酶 AncBDH1, 并成功将其在大肠杆菌中实现了可溶性表达。序列和家族分析显示 AncBDH1 属于短链醇脱氢酶家族, 具有保守的催化四联体、辅酶结合结构域, 并且与同源酶的序列一致性均较低, 证明了该酶的新颖性。酶学性质表征显示, AncBDH1 的最适反应 pH 值为 7.0, 最适反应温度为 60 °C, 未发现可以显著提高活力的金属离子, 表面活性剂可以提高 AncBDH1 的催化活力, 并且 AncBDH1 对 DMSO 等极性相对较高的溶剂表现出了较高的溶剂稳定性。AncBDH1 对多种双酮底物均表现出了催化活性, 具有较宽的底物谱。利用 AncBDH1 为生物催化剂进行了双乙酰底物不对称还原反应, 12 h 可将 200 mmol/L 双乙酰完全转化为(S)-乙偶姻, 是一个具有高效合成(S)-乙偶姻潜力的新型羧基还原酶。

REFERENCES

- [1] ZHANG YJ, LI SB, LIU LM, WU J. Acetoin production enhanced by manipulating carbon flux in a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 256-260.
- [2] ZHU CJ, SHEN T, LIU D, WU JL, CHEN Y, WANG LF, GUO K, YING HJ, OUYANG PK. Production of liquid hydrocarbon fuels with acetoin and platform molecules derived from lignocellulose[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(7): 2165-2174.
- [3] JI XJ, HUANG H, OUYANG PK. Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(3): 351-364.
- [4] LOSCHONSKY S, WALTZER S, BRECHT V, MÜLLER M. Elucidation of the enantioselective cyclohexane-1,2-dione hydrolase catalyzed formation of (S)-acetoin[J]. *ChemCatChem*, 2014, 6(4): 969-972.
- [5] XIE NZ, LI JX, HUANG RB. Biological production of (S)-acetoin: a state-of-the-art review[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2019, 19(25): 2348-2356.
- [6] 张锐, 戴翊飞, 孙金娣, 陆佳晨, 陈可泉. 酶祖先序列重建与定向进化[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(12): 4187-4200.
- ZHANG K, DAI YF, SUN JD, LU JC, CHEN KQ. Enzyme ancestral sequence reconstruction and directed evolution[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(12): 4187-4200 (in Chinese).
- [7] TRUDEAU DL, KALTENBACH M, TAWFIK DS. On the potential origins of the high stability of reconstructed ancestral proteins[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(10): 2633-2641.
- [8] DEVAMANI T, RAUWERDINK AM, LUNZER M, JONES BJ, MOONEY JL, TAN MAO, ZHANG ZJ, XU JH, DEAN AM, KAZLAUSKAS RJ. Catalytic promiscuity of ancestral esterases and hydroxynitrile lyases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(3): 1046-1056.
- [9] HENDRIKSE NM, CHARPENTIER G, NORDLING E, SYRÉN PO. Ancestral diterpene cyclases show increased thermostability and substrate acceptance[J]. *The FEBS Journal*, 2018, 285(24): 4660-4673.
- [10] GUMULYA Y, BAEK JM, WUN SJ, THOMSON RES, HARRIS KL, HUNTER DJB, BEHRENDORFF JBYH, KULIG J, ZHENG S, WU XM, WU B, STOK JE, de VOSS JJ, SCHENK G, JURVA U, ANDERSSON S, ISIN EM, BODÉN M, GUDDAT L, GILLAM EMJ. Engineering highly functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction[J]. *Nature Catalysis*, 2018, 1: 878-888.
- [11] ROZI MFAM, RAHMAN RNZRA, LEOW ATC, ALI MSM. Ancestral sequence reconstruction of ancient lipase from family I.3 bacterial lipolytic enzymes[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2022, 168: 107381.
- [12] CHEN XY, DOU Z, LUO TW, SUN ZW, MA HM, XU GC, NI Y. Directed reconstruction of a novel ancestral alcohol dehydrogenase featuring shifted pH-profile, enhanced thermostability and expanded substrate spectrum[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127886.
- [13] SHANATI T, LOCKIE C, BELOTI L, GROGAN G, ANSORGE-SCHUMACHER MB. Two enantiocomplementary ephedrine dehydrogenases from *Arthrobacter* sp. TS-15 with broad substrate specificity[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(7): 6202-6211.
- [14] 唐铭烱, 许国超, 倪晔. 双芳基酮还原酶的基因挖掘及催化性质[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(3): 240-249.
- TANG MH, XU GC, NI Y. Genome mining and characterization of diaryl ketone reductase from *Cluyveromyces polysporus*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37(3): 240-249 (in Chinese).
- [15] XU GC, BIAN YQ, HAN RZ, DONG JJ, NI Y. Cloning, expression, and characterization of *budC* gene encoding meso-2,3-butanediol dehydrogenase from *Bacillus licheniformis*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(3): 604-617.
- [16] LUO TW, DOU Z, SUN ZW, CHEN XY, NI Y, XU GC. A novel and robust 3-quinuclidinone reductase from *Kaistia algarum* for efficient synthesis of (R)-3-quinuclidinol without external cofactor[J]. *Molecular Catalysis*, 2021, 514: 111861.
- [17] MAKINO Y, NEGORO S, URABE I, OKADA H. Stability-increasing mutants of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264: 6381-6385.