

大肠杆菌转酮醇酶分子改造及催化酒石酸半醛合成

王剑峰^{1#}, 李文英^{1#}, 辛振麒¹, 冯文娜¹, 孙晓明^{1,2}, 袁建锋^{1,2}

1 浙江师范大学 行知学院, 浙江 兰溪 321100

2 浙江师范大学 化学与生命科学学院 浙江省野生动物生物技术与保护利用重点实验室, 浙江 金华 321004

王剑峰, 李文英, 辛振麒, 冯文娜, 孙晓明, 袁建锋. 大肠杆菌转酮醇酶分子改造及催化酒石酸半醛合成. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4615-4629.

WANG JF, LI WY, XIN ZQ, FENG WN, SUN XM, YUAN JF. Molecular engineering of transketolase from *Escherichia coli* and tartaric semialdehyde biosynthesis. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4615-4629.

摘要: 转酮醇酶 (transketolase, TK, EC. 2.2.1.1) 是一种焦磷酸硫胺素和二价阳离子依赖性酶, 可催化二碳单位的转移, 可逆形成 C-C 键, 在多酶催化生产化学品、药物前体和不对称合成方面有广泛应用。文中以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K12 转酮醇酶 TKTA 为研究对象, 通过定点饱和突变和组合突变提升对非磷酸化底物的反应活性, 并探索突变酶 TKTA_M 催化合成酒石酸半醛。结果表明: 突变酶 TKTA_M (R358I/H461S/R520Q) 最适反应温度为 32 °C, 最适反应 pH 为 7.0, 以 D-甘油醛为受体底物的比酶活为 (6.57±0.14) U/mg, 是野生型比酶活 ((0.71±0.02) U/mg) 的 9.25 倍。在酶学性质研究的基础上, 设计 20 mL 的反应体系, 以 50 mmol/L 5-酮基-D-葡萄糖酸和 50 mmol/L 非磷酸化乙醇醛为底物, TKTA_M 催化合成酒石酸半醛, 最终酒石酸半醛的产量为 3.71 g, 摩尔转化率为 55.34%。研究结果为生物质制备 L-(+)-酒石酸提供数据支撑, 同时为转酮醇酶催化非磷酸化底物提供了借鉴。

关键词: 转酮醇酶; 定点突变; 酶学性质; 生物催化

Received: March 24, 2022; Accepted: May 16, 2022; Published online: May 19, 2022

Supported by: Zhejiang Xinmiao Talent Project (2021R404051)

Corresponding author: YUAN Jianfeng. Tel: +86-579-88321092; E-mail: jf_yuan@zjnu.edu.cn

[#]These authors contributed equally to this study

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) (2021R404051)

Molecular engineering of transketolase from *Escherichia coli* and tartaric semialdehyde biosynthesis

WANG Jianfeng^{1#}, LI Wenying^{1#}, XIN Zhenqi¹, FENG Wenna¹, SUN Xiaomin^{1,2},
YUAN Jianfeng^{1,2}

1 Xingzhi College, Zhejiang Normal University, Lanxi 321100, Zhejiang, China

2 Key Laboratory of Wildlife Biotechnology and Conservation and Utilization of Zhejiang Province, College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: Transketolase (EC 2.2.1.1, TK) is a thiamine diphosphate-dependent enzyme that catalyzes the transfer of a two-carbon hydroxyacetyl unit with reversible C–C bond cleavage and formation. It is widely used in the production of chemicals, drug precursors, and asymmetric synthesis by cascade enzyme catalysis. In this paper, the activity of transketolase TKTA from *Escherichia coli* K12 on non-phosphorylated substrates was enhanced through site-directed saturation mutation and combined mutation. On this basis, the synthesis of tartaric semialdehyde was explored. The results showed that the optimal reaction temperature and pH of TKTA_M (R358I/H461S/R520Q) were 32 °C and 7.0, respectively. The specific activity on D-glyceraldehyde was (6.57±0.14) U/mg, which was 9.25 times higher than that of the wild type ((0.71±0.02) U/mg). Based on the characterization of TKTA_M, tartaric acid semialdehyde was synthesized with 50 mmol/L 5-keto-D-gluconate and 50 mmol/L non-phosphorylated ethanolaldehyde. The final yield of tartaric acid semialdehyde was 3.71 g with a molar conversion rate of 55.34%. Hence, the results may facilitate the preparation of L-(+)-tartaric acid from biomass, and provide an example for transketolase-catalyzed non-phosphorylated substrates.

Keywords: transketolase; site-directed mutation; enzyme characteristics; biocatalysis

L-(+)-酒石酸属于羟基羧酸类螯合剂,是有机酸领域的重要产品,在食品、医药、化工及纺织等领域具有广泛的应用^[1]。目前,市售L-(+)-酒石酸几乎都是通过酶法生产,即以顺式环氧琥珀酸水解酶(*cis*-epoxysuccinate hydrolase, CESH, EC 3.3.2.3)专一性水解环氧琥珀酸二钠盐制备获得^[2]。由于酶法制备L-(+)-酒石酸具有产品浓度和纯度高、转化效率高、安全性好等优点,成为L-(+)-酒石酸的主要生产方式。国内有多家企业实现了工业化生产,如杭州宝晶生物、常州常茂生化、临安金龙化工等,国内总产值占全球70%。然而,酶法制备L-(+)-酒石

酸的原料顺式环氧琥珀酸盐的合成主要依赖于石化资源。随着原料成本的不断上升,以及能源消耗和污染物排放指标控制日益趋严,国内L-(+)-酒石酸产业亟须新的技术进步^[3]。

国际上多个研究小组曾开展以可再生资源为原料的L-(+)-酒石酸制备方法,主要集中在以代谢工程为手段提高L-(+)-酒石酸的前体物质——5-酮基-D-葡萄糖酸(5-keto-D-gluconic acid, 5-KGA)的产量,如德国Jülich生物技术研究中心IBG-1^[4-6]、日本山口大学(Yamaguchi University)^[7-8],国内如张建国^[9]、贾士儒^[10-11]、林建平^[12-13]课题组都开展了相应的研究。随后,

5-KGA 在以钒酸盐^[14]、贵金属钨碳^[15]、过渡金属^[16]等为催化的条件下,可以制备 L-(+)-酒石酸。然而,该法仅处于研究阶段,尚无产业化报道,主要问题是化学催化选择效率不高、转化率低,反应过程不能集成,无法满足工业生产的要求。

从可再生资源出发,利用微生物直接制备 L-(+)-酒石酸是未来发展的方向,然而,天然微生物中并没有完整的 L-(+)-酒石酸合成代谢途径。澳大利亚 Ford 团队连续报道了酿酒葡萄 (*Vitis vinifera*) 中 L-(+)-酒石酸生物合成的两个重要酶: L-艾杜糖酸脱氢酶 (L-idonate dehydrogenase, L-IdnDH)^[17] 和 醛酮还原酶 (2-keto-L-gulonic acid reductase, Vv2KGR)^[18],并结合基因差异表达谱和同位素示踪的研究结果提出 L-(+)-酒石酸生物合成的代谢途径^[19-20],如图 1 所示。遗憾的是,该途径中催化 5-KGA 中 C4-C5 断裂的关键酶及催化机理尚不清楚,仅推测 5-KGA 经转酮醇酶 (transketolase, TK) 和酒石酸半醛脱氢酶 (tartaric semialdehyde dehydrogenase, TSAD) 转化,合成 L-(+)-酒石酸。

到目前为止,关于 L-(+)-酒石酸合成途径中推测催化 5-KGA 生成酒石酸的 TK 及 TSAD 的研究甚少。早期 Salusjärvi 等^[21]在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中过表达弱氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter suboxydans*) IFO12528 来源的葡萄糖酸盐/多元醇脱氢酶 (gluconate/polyol dehydrogenase) 合成 5-KGA,结果发现有 L-(+)-酒石酸生成,并推测 5-KGA 是在转酮醇酶和琥珀酸半醛脱氢酶作用下合成 L-(+)-酒石酸,但无证据证明这一点。然而,前人的研究已经为我们提供了一种有益的思路。

转酮醇酶 (transketolase, TK) 以乒乓反应机制进行催化, Wikner 通过定点突变的方式确定关键残基与底物和辅酶的结合,明确催化反应机制^[22]。Hibbert 等^[23]利用定点饱和突变的方式,证实 *E. coli* 来源 TKTA 的 R520 残基与底物磷酸基团相对接,获得的突变酶对非磷酸化底物催化活性提高了近 5 倍。在对 D469 的饱和突变中,获得 D469T 突变酶,对无 α -羟基的底物催化活性提升 2.5 倍^[24]。同样地, Zhou 等^[25]对嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus*

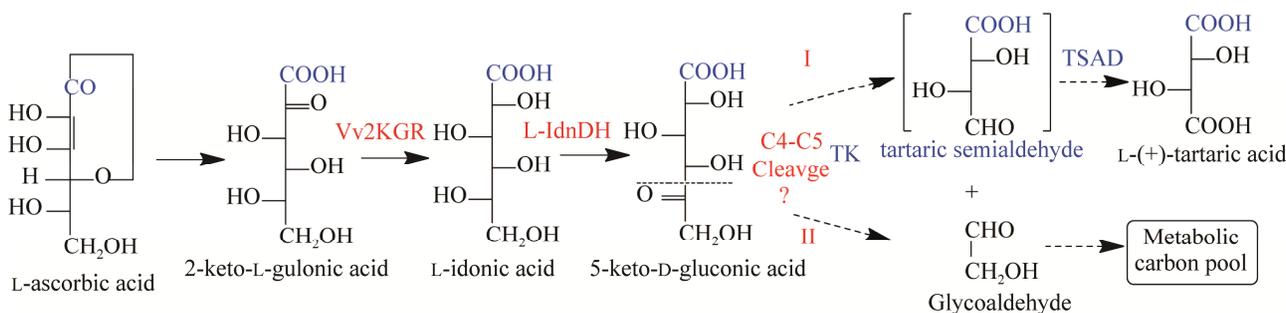


图 1 *Vitis vinifera* 中 L-(+)-酒石酸合成代谢途径^[20]

Figure 1 L-(+)-tartaric acid biosynthesis pathway in *Vitis vinifera*, modified according to the literature^[20]. Solid arrow represents L-ascorbic metabolic pathways, and dotted arrow represents L-(+)-tartaric acid synthetic pathway. The question mark indicates that the key enzyme, C4-C5 cleavage, has not been identified yet. Vv2KGR: 2-keto-L-gulonic acid reductase; L-IdnDH: L-idonic acid dehydrogenase; TK: hypothetical transketolase; TSAD: hypothetical tartaric semialdehyde dehydrogenase.

stearothermophilus) 转酮醇酶同源建模, 并通过组合突变的方式, 获得热稳定突变酶 F435L/D470E 和 L191V/D470I, 对无 α -羟基的底物催化活性提高 7.4 倍。Ranoux 等^[26]采用理性设计的进化方式, 对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 来源转酮醇酶进行改造, 获得多种突变酶 (R526N、R526Q、R526Q/S525T、R526K/S525T) 对非磷酸化的长链多元醇醛 (long polyol aldehyde) 的催化活性提高 2.6 倍。值得注意的是, 以羟基丙酮酸 (hydroxy-pyruvic acid, HPA) 作为供体底物, 反应将不可逆释放 CO₂, 为转酮酶高通量筛选提供了途径^[27]。有鉴于此, 通过对转酮醇酶的分子改造, 可获得具有一定应用潜力的生物催化元件。本文首先克隆与表达 *E. coli* K12 株来源的转酮醇酶基因 *tktA*, 通过 TKTA 结构模拟和多序列比对, 对

底物磷酸基团结合位点 R358、S385、H461 和 R520 进行定点饱和突变和组合突变, 筛选能接受非磷酸化底物的突变酶。在对突变酶进行酶学性质研究的基础上, 探索以 5-KGA 为底物, 催化合成酒石酸半醛, 为可再生资源为原料制备 L-(+)-酒石酸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

E. coli K12、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH5 α 由本实验室保存; 克隆载体 pEASY-Blunt simple 购自 TransGen Biotech 公司; 表达载体 pET-28a(+) 购自 Novagen 公司; 本实验所用 PCR 引物 (表 1) 由安捷伦官网突变引物在线设计, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this work

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
TKA_ <i>Nde</i> I_F	TTCC <u>CATATG</u> TCCTCACGTAAG	22
TKA_ <i>Xho</i> I_R	CCG <u>CTCGAG</u> TTACAGCAGTTCTTTTGC	27
R358N_F	GAAAATCGCCAGC>NNAAAGCGTCTCAGAATGCTATCGAAGCGTTC	46
R358N_R	CTGAGACGCTTTNNGCTGGCGATTTTCGCCGATTAGCCTGCAG	45
S385N_F	CTGACCTGGCGCCG>NNAACCTGACCCTGTGGTCTGGTTCTAAAGC	46
S385N_R	CAGGGTCAGGTTNNGCGGCCAGGTCAGCAGAACCGCCGAG	42
H461N_F	GATGGTTTACACNNNGACTCCATCGGTCTGGGCGAAGACGGCC	44
H461N_R	CAGACCGATGGAGTCNNNGGTGTAACCATCACCTGACGCTGTTTC	46
R520N_F	CACTGATCCTCTCCNNNCAGAACCTGGCGCAGCAGGAACGAACCTG	45
R520N_R	GCCAGGTTCTGNNNGAGAGGATCAGTGCGGTTCGGGCCGTCCTG	44
R358I_F	GGCGAAAATCGCCAGCATCAAAGCGTCTCAGAATGC	36
R358I_R	GCATTCTGAGACGCTTTGATGCTGGCGATTTTCGCC	36
H461S_F	CAGGTGATGGTTTACACCTCCGACTCCATCGGTCTGGG	38
H461S_R	CCCAGACCGATGGAGTCGGAGGTGTAACCATCACCTG	38
R520Q_F	CACTGATCCTCTCCAAACAGAACCTGGCGCAG	32
R520Q_R	CTGCGCCAGGTTCTGTTGGGAGAGGATCAGTG	32

The bold and underlined bases represent the restriction enzyme site, and bold bases represent mutated site.

1.1.2 主要试剂

PrimeSTAR Max Premix DNA Polymerase 套装、限制性内酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司；QuickChange 定点突变试剂盒购自 Agilent Technologies 公司；DNA 胶回收试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司；异丙基- β -D-硫代半乳糖 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)、抗生素、标准蛋白 Marker 及分子级别化学试剂均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.1.3 培养基及培养条件

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10 (固体平板加入 1.5% 琼脂粉), pH 自然。用于质粒构建、基因扩增和菌株培养。所有培养基或固体平板, 根据实验需要加入相应的抗生素。

试管培养: 单菌接种于 5 mL 的 LB 液体试管, 37 °C、220 r/min 振荡培养过夜。

摇瓶培养: 2% (V/V) 接种量接种于 50 mL 的 LB 培养基中, 添加终浓度为 50 μ g/mL 的卡那霉素, 37 °C、220 r/min 振荡培养。

1.2 方法

1.2.1 分子生物学操作方法

基本分子生物学操作均参照《分子克隆实验指南 (第 4 版)》进行^[28]。

1.2.2 重组质粒及重组表达菌株构建

E. coli K12 单菌经试管培养过夜, 13 140 r/min 离心 10 min 收集菌体, 按细菌基因组提取试剂盒操作制备 *E. coli* K12 基因组 DNA。以 *E. coli* K12 基因组为模板, TKA_Nde I_F 和 TKA_Xho I_R 为引物, PCR 扩增 *tktA* 基因片段 (2 004 bp)。PCR 产物经纯化试剂盒回收后, 进行平末端克隆, 获取克隆子 pEASY-Blunt-*tktA* 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序验证正确。*tktA* 基因片段和表达质粒 pET-28a(+) 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 胶回收后, T4 DNA 连接酶

16 °C 连接过夜, 构建重组质粒 pET-28a-*tktA*。重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布于 50 μ g/mL 卡那霉素平板, 37 °C 培养过夜。挑取转化子, 提取质粒, 双酶切验证正确, 成功构建重组表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-*tktA*。

1.2.3 酶的表达与纯化

重组菌单菌经试管培养, 转接摇瓶培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 并于 24 °C 降温培养 17 h。在 4 °C 条件下, 13 140 r/min 离心 10 min, 收集菌体细胞。用 2.0 mmol/L, pH 7.5 的 TEA 缓冲液洗涤并悬浮细胞, 在冰浴条件下超声破碎细胞 (SCIENTZ JY 96-IIIBN, 宁波), 经 4 °C、13 140 r/min 离心 20 min 去除细胞碎片。上清液通过 Ni-NTA 柱 (ProteinLso Ni-NTA Resin) 纯化, 再经 DeSalting Gravity Column (生工生物工程 (上海) 股份有限公司) 脱盐, 具体根据公司提供的操作说明进行。Bradford 法测定目标蛋白浓度, SDS-PAGE 进行酶蛋白均一性检测。

1.2.4 酶活测定

转酮醇酶酶活测定通过 pH-based 的方法进行^[27]。以 β -羟基丙酮酸锂作为供体底物, 经转酮醇酶作用后, 生成的 CO_2 溶于水形成 HCO_3^- , 导致溶液 pH 上升。以酚红作为指示剂, 实时测定反应体系在 560 nm 处的吸收值, 其大小与体系中 HCO_3^- 离子的量成正比, 并计算转酮醇酶的比活力。 HCO_3^- 标准曲线方程为: $y=0.1418x+0.31909$, $R^2=0.99342$ 。

转酮醇酶酶活测定体系 (200 μ L): 在 96 孔板中加入转酮醇酶 12 μ g、D-甘油醛 200 mmol/L、ThDP 2.4 mmol/L、 MgCl_2 9 mmol/L、三羟基乙醇胺 TEA (2.0 mmol/L, pH 7.5) 和酚红 0.028 mmol/L, 振荡混匀。加入 β -羟基丙酮酸

锂 50 mmol/L, 在 30 °C 条件下启动反应, 且在 10 s 内使用酶标仪测定 560 nm 处光吸值, 酶标仪设置为读酶学动力学模式, 每隔 10 s 读一次, 矫正 HCO_3^- 随时间变化, $y=0.010\ 85\ x+0.377\ 1$, $R^2=0.996\ 1$ 以此计算酶活。1 U 的酶活定义为: 每分钟内产生 1 μmol 产物所需的酶的质量。

比酶活 (U/mg)= $0.010\ 85\times 10^3\ [\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})]\times 60\ [\text{s}]\times 200\times 10^{-6}\ [\text{L}]/\text{酶量}\ [\text{mg}]$ 。

1.2.5 转酮醇酶分子改造

根据 *S. cerevisiae* 来源的转酮醇酶晶体结构信息^[26]及蛋白序列的比对, 选取距离底物 4 Å 的 R358、S385、H461 和 R520 位点, 进行突变库的构建。以重组质粒 pET-28a-*tkt A* 为模板, R358N_F/R358N_R、S385N_F/S385N_R、H461N_F/H461N_R 和 R520N_F/R520N_R 为引物, 分别进行 PCR 扩增, 结束后用 *Dpn I* 限制性内切酶消化模板质粒。将产物分别转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素平板, 37 °C 培养过夜, 分别构建 R358X、S385X、H461X 和 R520X 突变库。对突变库按 pH-based 法进行高通量筛选, 获取催化非磷酸化底物活性较高的突变酶, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。在此基础上, 进行组合定点突变, 提升转酮醇酶对非磷酸化底物的活性。

1.2.6 酶的最适反应 pH 和温度

按照 1.2.4 方法测定转酮醇酶反应最适 pH。测定选用如下缓冲体系: 2.0 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 3.0–6.0)、2.0 mmol/L 的 TEA 缓冲液 (pH 6.0–8.0)、2.0 mmol/L Tris-盐酸缓冲液 (pH 7.0–9.0) 和 2.0 mmol/L Gly-NaOH 缓冲液 (pH 9.0–11.0)。

在最适 pH 条件下, 按照 1.2.4 方法测定转酮醇酶反应的最适温度。温度考察范围为

20–60 °C。

将纯酶置于 30 °C、40 °C 和 50 °C 水浴中处理 20 h, 定点取样, 并以未经热处理的酶活设为 100%, 测定热处理后剩余的酶活。

1.2.7 动力学参数测定

在最适 pH 和温度条件下, 固定 β -羟基丙酮酸锂的浓度为 0.5 mmol/L, D-甘油醛的浓度为 0–0.5 mmol/L, 测定底物 D-甘油醛的 K_m 值和 V_{\max} 值; 同样地, 固定 D-甘油醛的浓度为 0.5 mmol/L, β -羟基丙酮酸锂的浓度为 0–0.5 mmol/L, 测定底物 β -羟基丙酮酸锂的 K_m 值和 V_{\max} 值。

1.2.8 非磷酸化底物测定

在最适 pH 和温度条件下, 以 5-KGA 作为供体底物, 对受体底物甲醛、乙醛、丙醛、乙醇醛、D-甘油醛、L-甘油醛、D-赤藓糖、D-核糖进行测定, 根据转酮醇酶对底物受体的相对活性评价受体底物。

1.2.9 转酮醇酶催化酒石酸半醛的合成

20 mL 反应体系包含转酮醇酶 1.2 mg、ThDP 2.4 mmol/L、 MgCl_2 9 mmol/L、TEA (2.0 mmol/L, pH 7.0)、受体底物 50 mmol/L 和 5-KGA 50 mmol/L, 在 32 °C 条件下反应 4 h。反应结束后, 加入 3 倍体积 60 mL 的甲醇, 并于 -20 °C 冰箱过夜, 使蛋白变性沉淀。经旋转蒸发去除甲醇后离心过滤, 去除变性蛋白。将滤液继续蒸干后, 加入 2.0 mL 纯净水溶解。采用 HPLC 法测定 5-KGA、酒石酸半醛的含量^[12], 并通过标准曲线方程 $y=155.569\ 88\ x-102.937\ 74$, $R^2=0.998\ 65$ 计算。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌转酮醇酶基因 *tkt A* 的克隆与表达

根据美国国家生物技术信息中心 (National

Center for Biotechnology Information, NCBI) 中 *E. coli* K12 基因组信息 (U00096.2)、转酮醇酶基因 *tkt A* (Gene ID: 947420), 序列长度为 1 992 bp, 酶蛋白 (YP_026188.1) 分子量为 72.2 kDa。按照 1.2.2 方法构建重组质粒 pET-28a-*tkt A*。PCR 产物、酶切验证和测序如图 2A、2D 所示, 特异性条带与目标 *tkt A* 基因一致, 序列正确。将重组质粒 pET-28a-*tkt A* 转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 构建重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-*tkt A*。按照 1.2.3 方法对重组菌进行诱导表达及纯化, 如图 2B、2C。重组菌经不同浓度 IPTG (0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L) 诱导表达, 收集破碎细胞上清液和沉淀 (溶于 8 mol/L 的尿素溶液) 进行 SDS-PAGE 分析发现, 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导效果较好, 可溶表达最高。粗蛋白经 Ni 柱亲和层析及脱盐, 得到 72 kDa 的单一一条带, 即

tkt A 基因在 *E. coli* BL21(DE3) 中成功表达。

2.2 转酮醇酶 TKTA 突变位点的选择

自然条件下, 转酮醇酶主要将含有酮羰基的二碳单位从 5-磷酸木酮糖转移至 4-磷酸赤藓糖或 5-磷酸核糖, 形成相应的多羟基酮糖。因此, 转酮醇酶的供体、受体底物主要是磷酸化的天然底物, 对于非磷酸化的底物, 其催化活性仅为磷酸化底物的百分之一^[29]。酵母来源转酮醇酶的 H30、H103 和 H263 与受体底物 C1、C2 及 C3 的结合相关, S386、R359、H469 和 R528 则与受体底物磷酸化基团的结合有关 (1NGS. pdb, <https://www.rcsb.org/structure/1NGS>)^[30]。通过多序列比对 (图 3) 发现, *E. coli* K12 和 *S. cerevisiae* 来源转酮醇酶的保守性大于 70%, 其中 R358、S385、H461 和 R520 与 *S. cerevisiae* 来源 TK 底物磷酸结合位点完全一致。

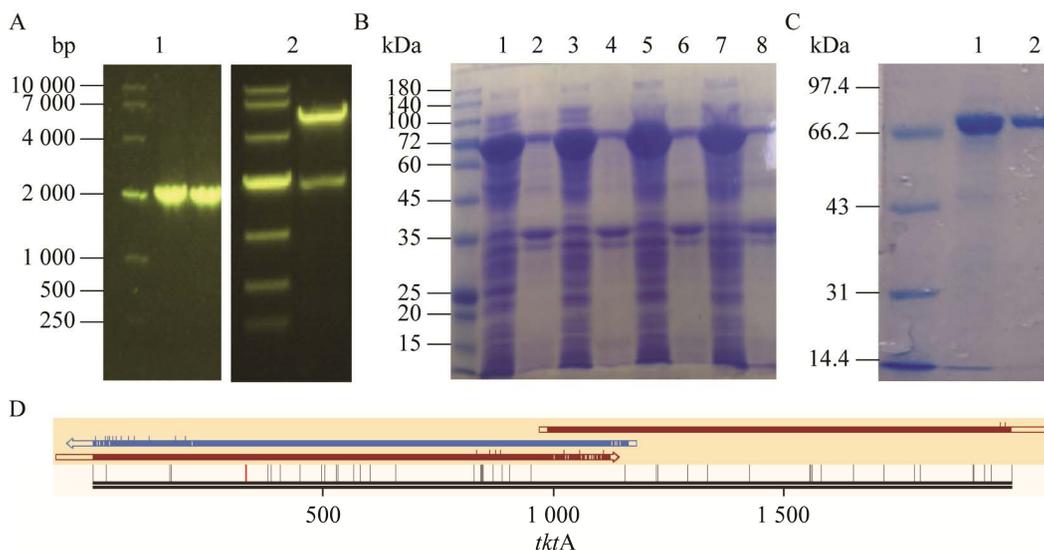


图 2 *E. coli* K12 转酮醇酶 *tkt A* 基因克隆、表达与纯化

Figure 2 Clone, expression and purification of *tktA* gene from *E. coli* K12. (A) 1: PCR amplification of *tkt A* gene; 2: double enzyme digestion to verify the pET-28a-*tkt A*. (B) *tkt A* gene expression induced by different IPTG concentrations (1–2: 0.1 mmol/L; 3–4: 0.2 mmol/L; 5–6: 0.5 mmol/L; 7–8: 1 mmol/L), in which 1, 3, 5, and 7 were soluble expressions, and 2, 4, 6, 8 were corresponding insoluble expression. (C) 1: TKTA after Ni-NTA purification; 2: TKTA after desalting. (D) Sequencing of *tkt A*.

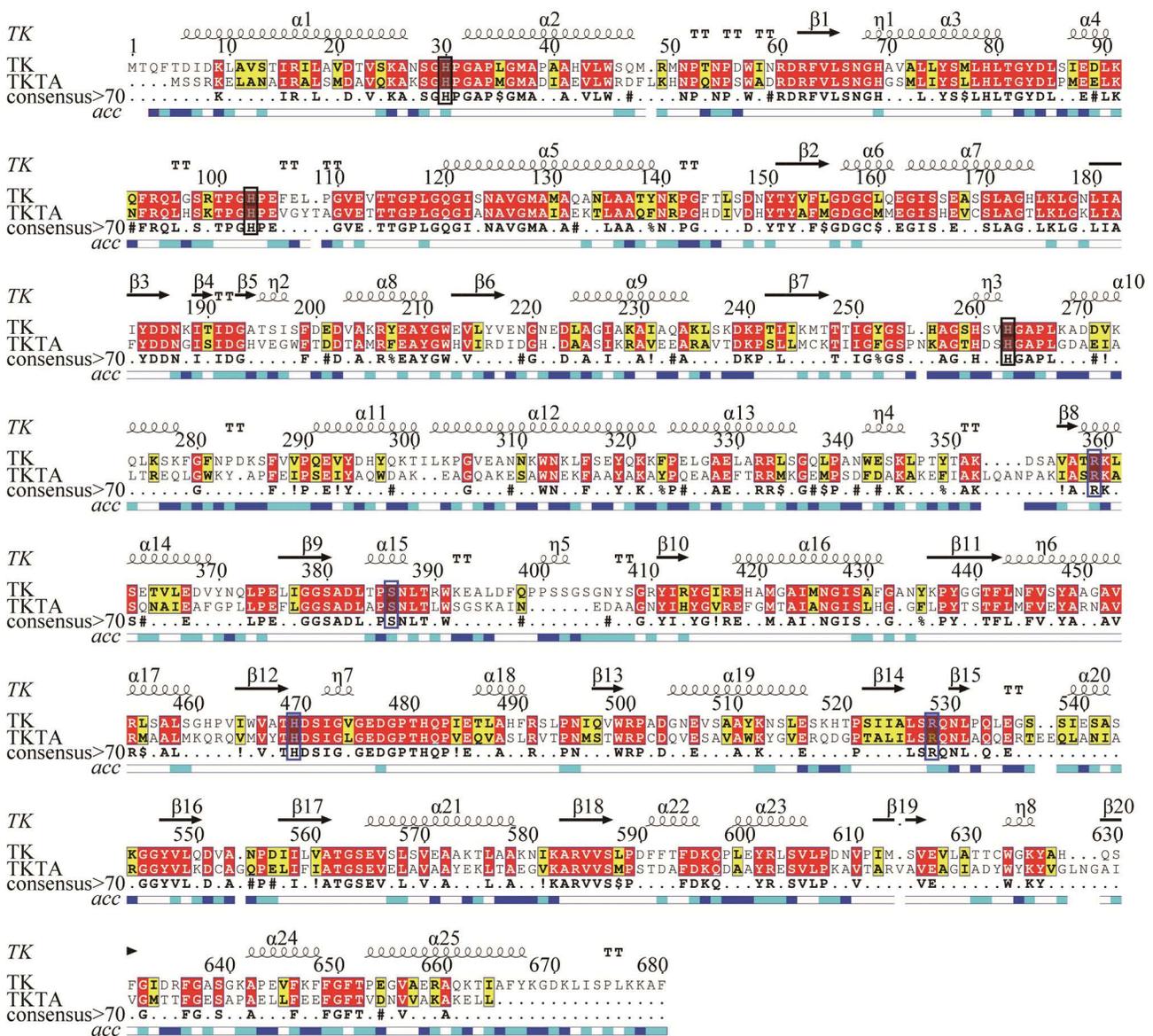


图3 转酮醇酶蛋白 TKTA 序列比对

Figure 3 Sequence alignment of TKTA enzyme from *E. coli* K12 against TK (1NGS.pdb) from *S. cerevisiae*. Black box highlight (H30, H103 and H263), C1, C2 and C3 of acceptor binding site; blue box highlight (R359, S386, H469 and R528), acceptor phosphate binding site.

利用 Pymol 2.5 软件 (<https://pymol.org/2/>), 以 PDB 数据 1QGD 晶体模型^[31]分析底物与 TKTA 对接残基, 结果如图 4 所示。残基 R358、S385 分别位于 14 和 15 的 α -螺旋, 而 H461、R520 分别位于 12 和 15 的 β -折叠区,

在空间结构上, 与受体底物的磷酸基团对接并形成氢键 (图 4B)。因此, 选取 TKTA 距离磷酸化底物 4 Å 范围内的 R358、S385、H461 和 R520 进行定点饱和突变, 以提高 *E. coli* K12 来源 TKTA 对非磷酸化受体底物的催化活性。

2.3 突变酶的构建及筛选

根据选择的突变位点,按照 1.2.5 方法对 R358、S385、H461 和 R520 位点进行饱和突变,构建饱和突变库。第一轮使用 50 mmol/L 的 D-甘油醛为受体,对 4 个单点突变库 R358X、S385X、H461X 和 R520X 各挑 192 个突变体,按照 pH-based 法分别筛选活性较高的前 40 个突变株。突变株经 37 °C、LB 培养后,提取质粒,并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,结果见表 2。所获 4 个突变库中,H461 和 R520 对

非磷酸化底物的影响较大。在 H461 位点共发现 3 种阳性突变,其中 H461S 突变酶催化 D-甘油醛的比酶活是野生酶的 4.99 倍,这种突变占总阳性突变(H461T、H461S 和 H461Q)的 15.00%。而在 R520 位点的突变库中,R520Q 催化 D-甘油醛的比酶活是野生酶的 4.27 倍,占该阳性突变库的 32.50%。据文献报道^[27],H461 和 R520 以及 R358 在活性口袋的入口处形成磷酸结合区,并确定磷酸化底物的特异性,这 3 个位点的突变提升了对非磷酸化底物的催化活性。

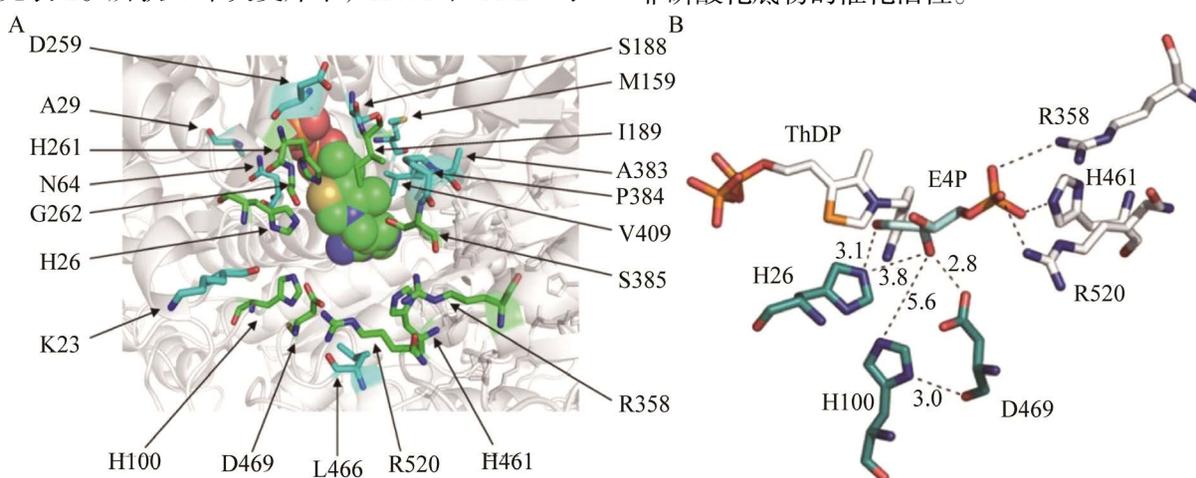


图 4 大肠杆菌转酮醇酶 TKTA 辅酶与底物结合位点

Figure 4 Coenzyme and substrate binding site of *E. coli* TKTA. (A) The structurally defined sites (green), and the phylogenetically defined sites (cyan), relative to the ThDP-cofactor^[23]. (B) The residues related to the ThDP-cofactor and erythrose-4-phosphate (E4P) as it binds^[24].

表 2 催化非磷酸化底物活性较高的突变体比较

Table 2 Comparison of specific activities on non-phosphorylated substrates of top performing mutants

No.	Enzymes	Specific activity (U/mg)	Specific activity related to WT	Percentage frequency (%)
Control	WT	0.71±0.02	1.00	100.00
1-1	R358P	0.92±0.03	1.30	47.50
1-2	R358I	1.14±0.11	1.61	22.50
1-3	R358T	0.87±0.14	1.23	30.00
1-4	S385G	0.79±0.10	1.11	77.50
1-5	S385P	0.85±0.21	1.20	22.50
1-6	H461T	2.87±0.08	4.04	12.50
1-7	H461S	3.54±0.17	4.99	15.00
1-8	H461Q	1.12±0.13	1.58	72.50
1-9	R520V	2.14±0.25	3.01	22.50
1-10	R520P	1.52±0.04	2.14	20.00
1-11	R520G	1.46±0.15	2.06	25.00
1-12	R520Q	3.03±0.27	4.27	32.50
2-1	R358I/H461S	4.15±0.11	5.84	—
2-2	R358I/R520Q	3.82±0.21	5.38	—
2-3	H461S/R520Q	4.88±0.09	6.87	—
2-4	R358I/H461S/R520Q	6.57±0.14	9.25	—

在第一轮饱和突变及筛选的基础上, 进行第二轮组合突变, 以突变株 1-2 (R358I)、1-7 (H461S) 和 1-12 (R520Q) 为出发株, 以 R358I_F/ R358I_R、H461S_F/H461S_R 和 R520Q_F/R520Q_R 进行组合定点突变, 并按 pH-based 法筛选较高非磷酸化底物催化活性的突变株, 挑取阳性突变株送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 结果如表 2 所示。第二轮的组合突变进一步证实, R358、H461 和 R520 与磷酸化底物的结合相关, 特别是 2-4 (R358I/H461S/R520Q) 催化 D-甘油醛的比酶活为 (6.57 ± 0.14) U/mg, 是野生酶的 9.25 倍。因此, 通过对 *E. coli* K12 的转酮醇酶的分子改造, 获得对非磷酸化底物催化活性较高的突变酶 2-4, 并命名为 TKTA_M。

2.4 野生酶与突变酶的酶学性质

2.4.1 pH 对野生酶和 TKTA_M 酶活影响

野生酶和突变酶 TKTA_M 在不同 pH 条件下反应的酶活结果如图 5A。突变酶 TKTA_M 与野生酶催化反应的最适 pH 均为 7.0, 且以 TEA 缓冲液为佳。在较低的 pH 条件下 (pH 3.0–4.0), 突变酶 TKTA_M 与野生酶酶活几乎为 0。在 pH 5.0–8.0 之间时, 突变酶 TKTA_M 与野生酶酶活保持在最高活力的 60% 以上。在 pH 8.0–11.0 条件下, 突变酶 TKTA_M 与野生酶酶活一致, 呈下降趋势, 但总体活性均高于 pH 3.0–4.0 条件下的酶活。说明 *E. coli* K12 来源的转酮醇酶 TKTA 和突变酶 TKTA_M 在碱性条件下更稳定, 这与 Jahromi 等^[32]发现大肠杆菌转酮醇酶 TK 在 pH 11.0 时, 其酶活为最高酶活的 50% 相吻合。

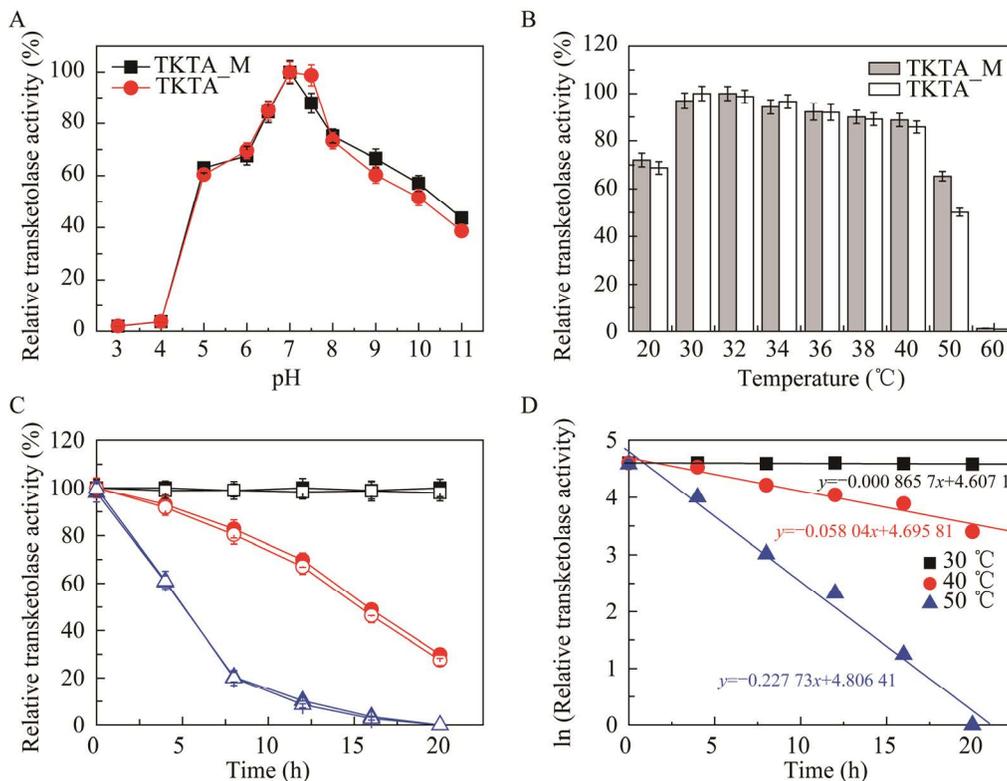


图 5 pH 及温度对转酮醇酶活性和稳定性的影响

Figure 5 Effect of pH and temperature on the activity and stability of wild type and mutant TKTA_M. (A) Optimal pH. (B) Optimal temperature. (C) Thermal stability, black means 30 °C, red means 40 °C, blue means 50 °C, full means TKTA_M, blank means wild type enzyme TKTA. (D) K_d and $t_{1/2}$ of TKTA_M.

2.4.2 温度对野生酶和 TKTA_M 酶活影响

在最适 pH 7.0 条件下, 考察不同反应温度对野生酶和突变酶 TKTA_M 酶活的影响, 结果见图 5B。总体上野生酶和突变酶对反应温度保持较高的一致性。在 30–40 °C 范围内, 两者酶活均保持在最高酶活的 90% 以上, 野生酶最适反应温度为 30 °C, 而突变酶 TKTA_M 在 32 °C 时活性最高。在 50 °C 时, 突变酶 TKTA_M 仍有 65.31% 左右的活性, 野生酶还有 50.12% 的活性; 但在 60 °C 时, 两者的反应活性几乎完全失活。

由图 5C 可知, 野生酶和突变酶的热稳定性几乎没有太大的区别。30 °C 处理 20 h 后, 两者的酶活基本没有损失; 40 °C 处理 20 h 后, 野生酶和突变酶的剩余酶活分别为初始的 27.48% 和 29.69%; 而经 50 °C 处理时, 两者酶活较不稳定, 失活较快。放置 8 h 后, 野生酶和突变酶的残余酶活分别为初始活性的 20.01% 和 20.39%, 放置 20 h 后, 两者几乎完全失活。图 5D 结果显示, 突变酶 TKTA_M 在 40 °C 和 50 °C 的失活常数 K_d 分别为 0.058 h^{-1} 和 0.228 h^{-1} , 根据公式 $t_{1/2} = \ln 2 / K_d$ 计算得到半衰期分别为 11.95 h 和 3.04 h。由此可见, 突变酶 TKTA_M

在 40 °C 以上的热稳定性相对较低, 而在 30 °C 较稳定, 失活常数为 0.000866 h^{-1} , 半衰期 $t_{1/2}$ 为 800.68 h。

2.5 TKTA_M 酶动力学参数测定

在最适反应温度 32 °C, 最适反应 pH 7.0 (2.0 mmol/L 的 TEA 缓冲液) 条件下, 测定突变酶 TKTA_M 动力学参数。如图 6 和表 3 所示, 根据拟合的反应曲线, 以双倒数法测定 β -羟基丙酮酸锂和 D-甘油醛的 K_m 值分别为 0.17 mmol/L 和 0.26 mmol/L; V_{\max} 值分别为 $0.93 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 和 $1.40 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$; k_{cat} 值分别为 1.12 s^{-1} 和 1.68 s^{-1} 。因此, 可以计算 k_{cat}/K_m 分别为 $6.59 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 和 $6.46 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 。以上结果表明, TKTA_M 对非磷酸化底物 HPA-Li 和 D-甘油醛具有较高的亲和力。

2.6 非磷酸化底物谱测定

为进一步探索突变酶 TKTA_M 对 5-KGA 的催化, 在最适 pH 和温度条件下, 以 5-KGA 作为供体底物, 根据转酮醇酶对底物的活性筛选较优非磷酸化底物。实验中选取甲醛、乙醛、丙醛、乙醇醛、D-甘油醛、L-甘油醛、D-赤藓糖、D-核糖作为底物, 通过 1.2.4 方法测定反应酶活。

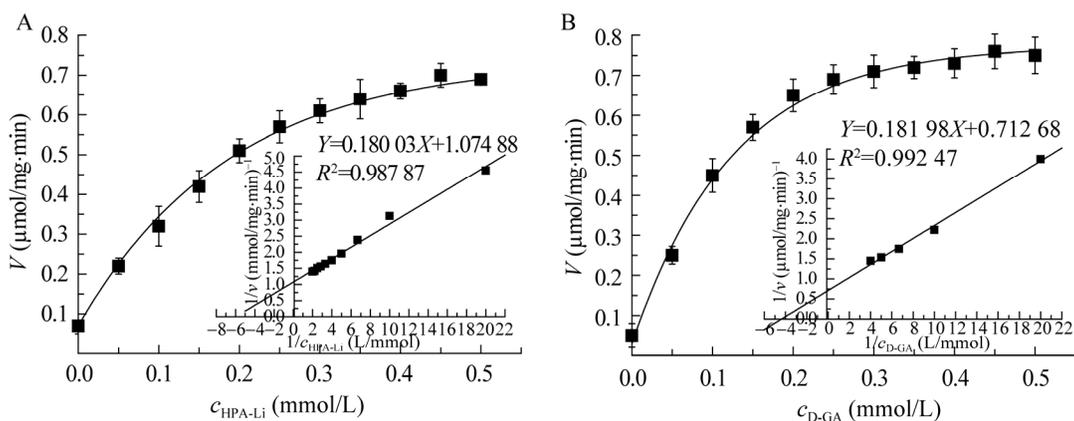


图 6 突变酶 TKTA_M 反应动力学参数测定

Figure 6 Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk reciprocal plot of TKTA_M with different substrate. (A) β -hydroxypropyruvate lithium. (B) D-GA.

表 3 突变酶 TKTA_M 的动力学参数 (32 °C, pH 7.0)

Table 3 The kinetic parameter of TKTA_M (32 °C, pH 7.0)

Substrates	V_{\max} ($\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
HPA-Li	0.93	0.17	1.12	6.59
D-GA	1.40	0.26	1.68	6.46

表 4 突变酶 TKTA_M 催化反应受体底物

Table 4 Substrates scope of TKTA_M

Substrates	Specific activity (U/mg)
Formaldehyde	1.29±0.02
Acetaldehyde	0.60±0.08
Propionaldehyde	0.13±0.03
Glycolaldehyde	4.09±0.44
D-glyceraldehyde	3.72±0.41
L-glyceraldehyde	0.091±0.021
D-erythrose	2.64±0.23
D-ribose	0.28±0.02

由表 4 结果可知, α 位具有羟基且羟基构型为 R 构型的一类受体底物的活性较强, 如乙醇醛 ((4.09±0.44) U/mg)、D-甘油醛 ((3.72±0.41) U/mg), 而催化 α 位没有羟基或者有羟基且羟基为 S 构型的一类受体底物的活性较弱, 如甲醛 ((1.29±0.02) U/mg)、乙醛 ((0.60±0.08) U/mg) 和 L-甘油醛 ((0.091±0.021) U/mg)。同时, 随着受体底物分子的增大, 受活性口袋的限制, 其比酶活逐渐降低, 说明 TKTA_M 酶虽已提高非磷酸化底物的催化活性, 但仍受底物的构型和分子空间大小的限制。另外, 由于供体底物为 5-KGA, 在分子空间结构上明显大于 β -羟基丙酮酸锂, 使得辅酶 ThDP 与供体之间的空间位阻增大, 催化活性降低。

2.7 TKTA_M 催化酒石酸半醛的合成

据文献报道^[29], 在转酮醇酶底物口袋的催化部位存在着一些保守的氨基酸残基, 使得不同来源的转酮醇酶却有着相同的底物谱, 如大肠杆菌、酵母菌和菠菜来源的转酮醇酶。由 2.4.3 结果可知, 以 5-KGA 作为供体底物, 乙醇醛体现最佳反应活性, 因此, 我们选择乙醇

醛作为 TKTA_M 催化 5-KGA 的受体底物。按照 1.2.9 条件, 在 32 °C 下反应 4 h 后, 经 HPLC 测定, 突变酶 TKTA_M 催化 50 mmol/L 的 5-KGA 得到酒石酸半醛 3.71 g, 摩尔转化率为 55.34%。

3 讨论

转酮醇酶 TKTA 是所有生物糖代谢途径的关键酶, 在 C-C 键组合反应中有重要的潜能, 被应用于生物活性物质、药物和化学品的多酶合成中, 如 6-脱氧-D-果糖^[33]、3-羟基酮^[34]、芳香氨基酸^[35]等。本研究作为前人研究的补充, 重点关注 TKTA 催化 5-KGA, 合成 L-(+)-酒石酸的前体物质, 酒石酸半醛, 而在此之前, 5-KGA 从未被认为是转酮醇酶的底物。本文首先克隆表达 *E. coli* K12 来源的转酮醇酶编码基因 *tktA*, 并通过三维结构和多序列比对分析, 选取 4Å 范围内受体底物磷酸基团结合位点进行饱和突变与组合突变。突变酶 TKTA_M (R358I/H461S/R520Q) 的比酶活为 (6.57±0.14) U/mg, 对非磷酸化底物的活性高于野生酶, 特别是对 D-甘油醛的比酶活是野生酶的 9.25 倍。根据分子模拟对接结果 (图 4), H461 残基的咪唑环直接与受体底物磷酸基团对接, 突变酶 H461S 和 H461T 对非磷酸化的 D-甘油醛的比酶活是野生酶的 4 倍以上, 我们推测将 His 突变为分支氨基酸后, 去除了 His 的正电荷, 降低对磷酸基团的特异性结合。对 D-甘油醛的比酶活测定 (表 2) 表明, 突变酶 R520P 和 R520G 是野生酶的 2.00 倍左右, R520V 是野生酶的 3.01 倍, 说

明 R520 残基不仅与底物的磷酸基团对接,同时还与底物进入的活性口袋有关,以上的突变去除 Arg 的侧链空间位阻效应,使得底物更易进入活性位点。突变酶 R358P、R358I 和 R358T 对 D-甘油醛的比酶活分别是野生酶的 1.30、1.61 和 1.23 倍,反应出 R358 残基对底物进入活性位点的作用效果弱于 H461 和 R520。另外,在酵母来源 TK 中的 H30 和 H263 残基和受体底物及辅因子的结合相关,D477 和 H481 残基与底物侧链基团结合相关^[36],说明以上位点虽与底物磷酸基团结合无关,但涉及反应底物与酶结合的空间位阻,对 TKTA 改造过程中位点选择仍十分重要。

不同来源的转酮醇酶的特性已有多篇报道,根据来源可将转酮醇酶分为嗜热菌转酮醇酶和非嗜热菌转酮醇酶,但嗜热菌的转酮醇酶比酶活不高,并且在 60 °C 以下基本没有活性,很难满足工业应用。而非嗜热来源的转酮醇酶最适 pH 大多在 7.0–8.0 左右,最适温度 25–37 °C 不等。本文对突变酶 TKTA_M 和野生酶酶学性质进行研究,发现两者的最适 pH 和最适温度基本一致(图 5)。该酶在温度 30–40 °C、pH 7.0–7.5 范围内能保持较高的催化活力。当温度超过 50 °C,TKTA_M 酶活快速下降,60 °C 时完全失活。Sprenger 和 Pohl 曾报道^[37],*E. coli* 来源的 TKTA 具有宽泛的最适反应温度,然而 Jahromi 等^[32]报道 *E. coli* 来源 TKTA 经 55 °C 处理 1 h 后,冷却至室温,反应活性增加 3 倍,而经 58.3 °C 处理后,TKTA 酶完全失活。这可能是在一定的温度范围内,适当提高温度,有助于在表达纯化过程中发生变性错配的二级结构,重新再次折叠形成有效的催化部位。热稳定性实验证实(图 5C、5D),TKTA_M 在 30 °C 较稳定,失活常数为 0.000 866 h⁻¹,半衰期 $t_{1/2}$ 为 800.68 h。对非磷酸化底物 HPA-Li 和

D-甘油醛的 K_{cat}/K_m 分别为 6.59 L/(mmol·s) 和 6.46 L/(mmol·s),说明突变酶 TKTA_M 对非磷酸化底物的亲和力较高,拓宽了催化反应底物的范围。

目前,还没有关于酶催化 5-KGA 制备 L-(+)-酒石酸的报道,本文对 *E. coli* K12 来源转酮醇酶进行分子改造,获得突变酶 TKTA_M。最终 TKTA_M 催化 5-KGA (50 mmol/L) 得到酒石酸半醛 3.71 g,摩尔转化率为 55.34%。以上结果初步证实 5-KGA 到 L-(+)-酒石酸的可能性,为建立生物质合成 L-(+)-酒石酸打下基础,但仍有诸多问题需要解决,如供体底物与酶的结合问题、体内代谢途径设计问题、受体底物立体选择性问题等。总之,以生物制造为特征的先进生产方式是国际上物质加工方式的重要发展方向,也是当前发展低碳经济的重要途径。

REFERENCES

- [1] 金蕾蕾,陈方磊,王晓钟,等. dl-酒石酸的合成工艺研究. 高校化学工程学报, 2020, 34(5): 1235-1242.
Jin LL, Chen FL, Wang XZ, et al. Study on the synthetic process of dl-tartaric acid. J Chem Eng Chin Univ, 2020, 34(5): 1235-1242 (in Chinese).
- [2] Bao WN, Chen Y, Liao HX, et al. Isolation of *Penicillium expansum* WH-3 for the production of L-(+)-tartaric acid. J Zhejiang Univ Sci B, 2020, 21(10): 835-840.
- [3] 李永泉,谢志鹏,潘海峰,等. L-酒石酸高效生物合成技术及产业化,中国食品科学技术学会第十一届年会论文摘要集, 2014, 212-213.
Li YQ, Xie ZP, Pan HF, et al. Efficient biosynthesis and industrialization of L-tartaric acid. Abstract of 11th Annual Meeting of CIFST, 2014, 212-213 (in Chinese).
- [4] Herrmann U, Merfort M, Jeude M, et al. Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(1): 86-90.
- [5] Elfari M, Ha SW, Bremus C, et al. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost

- quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 66(6): 668-674.
- [6] Merfort M, Herrmann U, Ha SW, et al. Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *Biotechnol J*, 2006, 1(5): 556-563.
- [7] Ano Y, Shinagawa E, Adachi O, et al. Selective, high conversion of D-glucose to 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(3): 586-589.
- [8] Saichana I, Moonmangmee D, Adachi O, et al. Screening of thermotolerant *Gluconobacter* strains for production of 5-keto-D-gluconic acid and disruption of flavin adenine dinucleotide-containing D-gluconate dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(13): 4240-4247.
- [9] 李博义, 潘海峰, 孙伟荣, 等. 5-酮基-D-葡萄糖酸发酵生产的工艺条件优化. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1486-1490.
- Li BY, Pan HF, Sun WR, et al. Optimization of the fermentation conditions for 5-keto-D-gluconic acid production. *Chin J Biotech*, 2014, 30(9): 1486-1490 (in Chinese).
- [10] 谭之磊, 王洪翠, 魏彧翹, 等. 碳源和氮源对 5-酮基-葡萄糖酸生成的影响. *生物工程学报*, 2014, 30(1): 76-82.
- Tan ZL, Wang HC, Wei YQ, et al. Effects of carbon and nitrogen sources on 5-keto-gluconic acid production. *Chin J Biotech*, 2014, 30(1): 76-82 (in Chinese).
- [11] Li YY, Jia SR, Zhong C, et al. Scale-up of 5-keto-gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans* HGI-1. *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 305-312.
- [12] Yuan JF, Wu MB, Lin JP, et al. Enhancement of 5-keto-d-gluconate production by a recombinant *Gluconobacter oxydans* using a dissolved oxygen control strategy. *J Biosci Bioeng*, 2016, 122(1): 10-16.
- [13] Yuan JF, Wu MB, Lin JP, et al. Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM 2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *BMC Biotechnol*, 2016, 16(1): 42.
- [14] Matzerath I, Kläui W, Klasen R, et al. Vanadate catalysed oxidation of 5-keto-D-gluconic acid to tartaric acid: the unexpected effect of phosphate and carbonate on rate and selectivity. *Inorganica Chimica Acta*, 1995, 237(1/2): 203-205.
- [15] Hoshino T, Tazoe M, Kobayashi S, et al. Process for production of organic acids: WO, 2011001696. 2011-01-06.
- [16] Yuan JF, Wu MB, Lin JP, et al. Selective oxidation of 5-keto-D-gluconate to L-(+)-tartaric acid on transition metal chelate catalyst. *Inorganica Chimica Acta*, 2016, 450: 251-257.
- [17] DeBolt S, Cook DR, Ford CM. L-tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *PNAS*, 2006, 103(14): 5608-5613.
- [18] Jia Y, Burbidge CA, Sweetman C, et al. An aldo-keto reductase with 2-keto-l-gulonate reductase activity functions in L-tartaric acid biosynthesis from vitamin C in *Vitis vinifera*. *J Biol Chem*, 2019, 294(44): 15932-15946.
- [19] Melino VJ, Soole KL, Ford CM. Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 145.
- [20] Burbidge CA, Ford CM, Melino VJ, et al. Biosynthesis and cellular functions of tartaric acid in grapevines. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 643024.
- [21] Salusjärvi T, Povelainen M, Hvorslev N, et al. Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(3): 306-314.
- [22] Wikner C, Meshalkina L, Nilsson U, et al. His103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur J Biochem*, 1995, 233(3): 750-755.
- [23] Hibbert EG, Senussi T, Costelloe SJ, et al. Directed evolution of transketolase activity on non-phosphorylated substrates. *J Biotechnol*, 2007, 131(4): 425-432.
- [24] Hibbert EG, Senussi T, Smith MEB, et al. Directed evolution of transketolase substrate specificity towards an aliphatic aldehyde. *J Biotechnol*, 2008, 134(3/4): 240-245.
- [25] Zhou CQ, Saravanan T, Lorillière M, et al. Second-generation engineering of a thermostable transketolase (TK gst) for aliphatic aldehyde acceptors with either improved or reversed stereoselectivity. *Chembiochem*, 2017, 18(5): 455-459.
- [26] Ranoux A, Karmee SK, Jin JF, et al. Enhancement of the substrate scope of transketolase. *Chembiochem*,

- 2012, 13(13): 1921-1931.
- [27] Yi D, Devamani T, Abdoul-Zabar J, et al. A pH-based high-throughput assay for transketolase: fingerprinting of substrate tolerance and quantitative kinetics. *Chembiochem*, 2012, 13(15): 2290-2300.
- [28] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014.
- [29] 周超强. 耐热转酮酶的定向进化及其在手性羟基酮合成中的应用[D]. 上海: 华东理工大学, 2016.
Zhou CQ. Directed evolution of thermostable transketolase for its synthetic application of chiral ketol-type [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2016 (in Chinese).
- [30] Golbik R, Meshalkina LE, Sandalova T, et al. Effect of coenzyme modification on the structural and catalytic properties of wild-type transketolase and of the variant E418A from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, 2005, 272(6): 1326-1342.
- [31] Littlechild J, Turner N, Hobbs G, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic data with *Escherichia coli* transketolase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1995, 51(Pt 6): 1074-1076.
- [32] Jahromi RRF, Morris P, Martinez-Torres RJ, et al. Structural stability of *E. coli* transketolase to temperature and pH denaturation. *J Biotechnol*, 2011, 155(2): 209-216.
- [33] Hecquet L, Bolte J, Demuynck C. Chemoenzymatic synthesis of 6-deoxy-D-fructose and 6-deoxy-L-sorbose using transketolase. *Tetrahedron*, 1994, 50(29): 8677-8684.
- [34] Myles DC, Andrulis PJ III, Whitesides GM. A transketolase-based synthesis of (+)-exo-brevicomin. *Tetrahedron Lett*, 1991, 32(37): 4835-4838.
- [35] Henkes S, Sonnewald U, Badur R, et al. A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 2001, 13(3): 535-551.
- [36] Joshi S, Singh AR, Saqib U, et al. Identification of potential *P. falciparum* transketolase inhibitors: pharmacophore design, *in silico* screening and docking studies. *J Biophys Chem*, 2010, 1(2): 96-104.
- [37] Sprenger GA, Pohl M. Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. *J Mol Catal B Enzym*, 1999, 6(3): 145-159.

(本文责编 陈宏宇)