

来源于泗阳鞘氨醇杆菌的聚磷酸激酶的克隆表达及在ATP再生系统中的应用

黄欣¹, 李益民¹, 杜聪¹, 袁文杰^{1,2}

1 大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024

2 大连理工大学 宁波研究院, 浙江 宁波 315000

黄欣, 李益民, 杜聪, 袁文杰. 来源于泗阳鞘氨醇杆菌的聚磷酸激酶的克隆表达及在ATP再生系统中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4669-4680.

HUANG X, LI YM, DU C, YUAN WJ. Expression of polyphosphate kinase from *Sphingobacterium siyangensis* and its application in ATP regeneration system. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4669-4680.

摘要: 聚磷酸激酶 (polyphosphate kinase, PPK) 在体外催化合成ATP的反应中有着重要作用。为寻找能利用短链聚磷酸盐 (polyphosphate, polyP) 为底物高效合成ATP的聚磷酸激酶, 本文以来源于泗阳鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium siyangensis*) 的聚磷酸激酶 (PPK2) 为研究目标, 利用pET-29a构建重组质粒, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中表达, 并将其作为ATP再生系统的关键酶与L-氨基酸连接酶 (YwfE) 联用生产丙谷二肽 (Ala-Gln)。ppk2长度为810 bp, 编码270个氨基酸; SDS-PAGE结果表明PPK2为可溶性表达, 分子量为29.7 kDa。对PPK2的最适反应条件进行了优化, 结果发现其在22–42 °C、pH 7–10的范围内均可以保持较好活性, 且在37 °C、pH为7、镁离子 (Mg²⁺) 浓度为30 mmol/L、底物ADP与六偏磷酸钠浓度分别为5 mmol/L和10 mmol/L时酶活最大, 在0.5 h时ATP产率可以达到理论值的60%以上。作为模式反应体系, 当PPK2与YwfE联用生产Ala-Gln时, 达到与直接添加ATP相同的效果。此聚磷酸激酶作为ATP再生系统具有较好的适用性, 适用的温度和pH范围广, 且能以廉价易得的短链polyP为底物高效合成ATP, 为依赖ATP的催化反应体系的能量再生提供了新酶的来源。

关键词: 泗阳鞘氨醇杆菌; 聚磷酸激酶; ATP再生; 双酶偶联; 二肽

Received: April 19, 2022; Accepted: June 6, 2022

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (DUT21YG130); Chinese Postdoctoral Science Foundation (2021M690518)

Corresponding author: LI Yimin. E-mail: yiminli@dlut.edu.cn

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (DUT21YG130); 中国博士后基金 (2021M690518)

Expression of polyphosphate kinase from *Sphingobacterium siyangensis* and its application in ATP regeneration system

HUANG Xin¹, LI Yimin¹, DU Cong¹, YUAN Wenjie^{1,2}

1 School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

2 Ningbo Research Institute, Dalian University of Technology, Ningbo 315000, Zhejiang, China

Abstract: Polyphosphate kinase plays an important role in the catalytic synthesis of ATP *in vitro*. In order to find a polyphosphate kinase that can efficiently synthesize ATP using short-chain polyphosphate (polyP) as substrate, the polyphosphate kinase 2 (PPK2) from *Sphingobacterium siyangensis* was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). As an enzyme for ATP regeneration, PPK2 was used in combination with L-amino acid ligase (YwfE) to produce L-alanyl-L-glutamine (Ala-Gln). The length of *ppk2* of *S. siyangensis* is 810 bp, encoding 270 amino acids. The SDS-PAGE showed that PPK2 was expressed correctly and its molecular weight was 29.7 kDa as expected. The reaction conditions of PPK2 were optimized. PPK2 could maintain good activity in the range of 22–42 °C and pH 7–10. The highest enzyme activity was observed at 37 °C, pH 7, 30 mmol/L magnesium ion (Mg²⁺), 5 mmol/L ADP and 10 mmol/L sodium hexametaphosphate, and the yield of ATP reached 60% of the theoretical value in 0.5 hours at this condition. When used in combination with YwfE to produce Ala-Gln, the PPK2 showed a good applicability as an ATP regeneration system, and the effect was similar to that of direct addition of ATP. The PPK2 from *S. siyangensis* shows good performance in a wide range of temperature and pH, synthesizes ATP with cheap and readily available short chain polyP as substrate. The PPK2 thus provides a new enzyme source for ATP dependent catalytic reaction system.

Keywords: *Sphingobacterium siyangensis*; polyphosphate kinase; ATP regeneration; double enzyme coupling; dipeptide

三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 是一种带有 3 个磷酸基团的化合物, 水解时释放大量能量, 可作为生物体和化学反应能量的直接供体。体内的许多生物反应都需要 ATP 的参与, 包括糖酵解、三羧酸循环、氧化磷酸化等过程; 在体外级联反应中, 利用生物合成酶催化反应时也需要 ATP 等作为能量供体^[1], 但是 ATP 的昂贵价格导致反应成本提高, 限制了该类反应的规模化生产^[2]。因此构建 ATP 再生系统在体外能量依赖性级联反应中起着重要作用, 可提高反应的经济性^[3]。

ATP 再生系统利用的酶主要是乙酸激酶、

丙酮酸激酶和聚磷酸激酶^[4]。乙酸激酶^[5]以二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 和乙酰磷酸 (acetylphosphate, ACP) 为底物合成 ATP, 虽然反应效率较高, 但是底物 ACP 不稳定, 价格贵, 限制了其在工业化中的应用; 丙酮酸激酶虽然可以在较低 ADP 浓度情况下有效生成 ATP^[6], 但其磷酸供体为昂贵且不易保存的磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP), 并且其催化反应产物为丙酮酸, 无法循环使用, 大量积累还会抑制丙酮酸激酶的作用^[7]; 聚磷酸激酶以无机聚磷酸盐 (inorganic polyphosphate, polyP) 为磷酸供体, 将 ADP 催

化合成 ATP。由于 polyP 容易制备、价格低廉,因此广泛用于催化 ATP 再生^[8-9]。

现有的聚磷酸激酶 (polyphosphate kinase, PPK) 主要分为两种: PPK1 和 PPK2。PPK1, 一般由 600–700 个氨基酸组成, 在以 ATP 和 polyP 作为底物的反应中, 偏向于合成 polyP, 即催化 ATP 上的磷酸转移到 polyP 上, 优先进行 ATP 的降解^[10]; PPK2 与 PPK1 无同源性, 约由 230 个氨基酸组成, 催化底物磷酸化, 且底物范围广泛, 包括单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP)、ADP 等^[11-12], 部分 PPK2 可以直接利用 AMP 催化生成 ATP^[13]。基于 PPK 的 ATP 再生系统已用于合成多种化合物^[14], 如: 谷胱甘肽^[15]、D-木酮糖-5-磷酸^[16]、L-茶氨酸^[17]、尿苷三磷酸^[18]等, 但多数使用的是 PPK1 酶。

PolyP 是一种由数十到数百个正磷酸盐残基通过磷酸酐键连接而成的线性聚合物^[14]。大多数 PPK 仅在长链 polyP (超过 10 个磷酸残基) 存在时才具有活性, 然而与长链 polyP 相比, 低成本的短链 polyP (少于 10 个磷酸残基) 具有明显更好的工业竞争力^[6], 因此, 寻找可以利用短链 polyP 在体外酶催化系统中合成 ATP 的 PPK 意义重大。

本文研究了来源于泗阳鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium siyangensis*) 的聚磷酸激酶 (PPK2), 完成重组质粒的构建、蛋白的表达及酶活的测定, 并将其应用于丙谷二肽 (L-alanyl-L-glutamine, Ala-Gln) 合成过程中的 ATP 再生, 证明了泗阳鞘氨醇杆菌的 PPK2 可利用短 polyP 为底物进行 ATP 再生, 为依赖 ATP 的催化反应体系的能量再生提供了新酶的来源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

泗阳鞘氨醇杆菌 (*S. siyangensis*) 1.6855、

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 (DE3) 由本实验室保藏; 表达载体 pET-29a(+) 由本实验室保藏; 本研究所用 PCR 引物为 PPK-f (5'-TTCCATATGGCAGAGTACGATTTAAATGA ACTTCAGA-3') 和 PPK-r (5'-TAAAGCGGCCG CATCGTGT TTTGTGACGAAAGAATCT-3'), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.1.2 实验试剂

质粒提取试剂盒、产物纯化试剂盒购自南京诺威赞生物技术公司; DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购自 TaKaRa 公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 和抗生素购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 蛋白分子量标准品 (Marker) 购自北京索莱宝科技有限公司; 高效液相色谱 (HPLC) 使用的甲醇等溶剂均为色谱纯级别, 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组菌株构建

以泗阳鞘氨醇杆菌 *S. siyangensis* 1.6855 的菌液为模板, 使用特异性引物对 PPK-f、PPK-r 克隆目的基因 *ppk2* (NCBI reference sequence: WP_145326873.1), 并完成 PCR 产物纯化。利用限制性内切酶 (*Nde* I 和 *Not* I) 将目的基因 *ppk2* 和载体 pET29a 双酶切, 纯化后利用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接 16 h, 转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 于卡那霉素 (kanamycin, Kana) 抗性平板上筛选, 37 °C 培养过夜, 之后挑取单菌落进行菌落 PCR 验证。阳性的单菌落转接小瓶, 提取质粒进行双酶切验证, 获得重组质粒 pET29a-*ppk2*, 并将其转化入 *E. coli* BL21(DE3), 从而获得重组菌株 *E. coli* BL21 pET29a-*ppk2*。

1.2.2 重组蛋白的表达及表达条件优化

挑取重组菌株 *E. coli* BL21 pET29a-*ppk2* 加入含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Kana 的小瓶中过夜活化, 之后以 1% (V/V) 的接种量接入含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Kana 的摇瓶中进行扩培, 当 $OD_{600}=0.6\text{--}0.8$ 时, 添加终浓度为 0.6 mmol/L 的诱导剂 IPTG 进行蛋白诱导表达。利用低温离心机以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、7 000 r/min 的条件离心 10 min 收集菌体, 并用纯水洗涤菌体一次, 之后用磷酸缓冲盐 (phosphate-buffered saline, PBS) 缓冲液 (pH 7.5) 重悬菌体, 添加蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 后利用超声细胞破碎仪进行破碎, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、7 000 r/min 离心 10 min 得到细胞破碎上清液。利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测蛋白的表达情况。调整蛋白的诱导温度、诱导时间、诱导剂添加量, 探索出蛋白的最适表达条件。

1.2.3 酶的纯化

在蛋白的最适表达条件下完成重组蛋白的表达, 上清液通过 HisTrap HP 亲和层析 Ni 柱进行纯化, 首先使用漂洗缓冲液 (20 mmol/L 咪唑, 10 mmol/L 磷酸二氢钠, 10 mmol/L 磷酸氢二钠, 500 mmol/L 氯化钠) 处理柱子, 上样后, 再次使用漂洗缓冲液除去结合力弱的杂蛋白, 最后用洗脱缓冲液 (300 mmol/L 咪唑, 10 mmol/L 磷酸二氢钠, 10 mmol/L 磷酸氢二钠, 500 mmol/L 氯化钠) 洗脱目的蛋白, 得到的目的蛋白后通过 SDS-PAGE 检测其均一性, 利用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度。

1.2.4 酶活测定方法

聚磷酸激酶催化反应如下: $\text{ADP}+(\text{Pi})_n\rightarrow\text{ATP}+(\text{Pi})_{n-1}$, 由此, 可通过检测 ATP 生成率测定酶活。ATP 浓度使用高效液相色谱 (HPLC)

测定, HPLC 检测条件经优化后为: 色谱柱为 C_{18} (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 紫外检测器, 检测波长为 254 nm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20 μL , 流动相为 50 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液, 等梯度洗脱, 流速为 1 mL/min。利用以上检测条件进行 ATP、ADP 标准曲线的制作, 发现两者具有较好的线性, 因此使用外标法检测 ATP、ADP 的含量。反应体系为 10 mmol/L 的 ADP, 15 mmol/L 的六偏磷酸钠, 30 mmol/L 的 Mg^{2+} 的 PBS 溶液, 添加 0.5 mg/mL PPK, 调整 pH 为 8.0 后, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中反应 3 h, 99 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 5 min 终止反应, HPLC 检测 ATP 的浓度, 计算 ATP 产率。ATP 产率=ATP 实际产量/ATP 理论产量 \times 100%。聚磷酸激酶酶活性定义为: 每分钟生成 1 μmol ATP 为 1 U。

1.2.5 聚磷酸激酶与 ATP 依赖酶联用

L-氨基酸连接酶 YwfE 是一种 ATP 依赖酶, 它在 ATP 存在情况下催化两个 L-氨基酸合成多种功能性二肽^[19], 例如 YwfE 可以丙氨酸 (Ala) 和谷氨酰胺 (Gln) 为底物合成丙谷二肽 (Ala-Gln), 如图 1 所示, 而 Ala-Gln 常被用作术后病人的必需营养注射液^[20-22]。

为证明该 PPK2 酶的适用性, 在体外利用 L-氨基酸连接酶 (YwfE) 与聚磷酸激酶 (PPK2) 作为模式反应体系, 以 Ala 和 Gln 为底物, 利用 ADP 和 polyP, 催化生成 Ala-Gln。通过高效液相色谱法测定产生的 Ala-Gln 的浓度, 从而测定 YwfE 与 PPK2 协同作用的效果。反应体系为: 30 mmol/L 的 Ala, 60 mmol/L 的 Gln, 10 mmol/L 的 ADP, 15 mmol/L 的六偏磷酸钠, 45 mmol/L 的 Mg^{2+} , 于 27 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中反应, 99 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 5 min 终止反应, 恢复至室温后离心, 取上清液, 采用高效液相色谱法测定 Ala-Gln 的浓度, 并计算产率。Ala-Gln 产率=Ala-Gln 实际产量/Ala-Gln 理论产量 \times 100%。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET29a-*ppk2* 的构建

以 *S. siyangensis* 1.6855 为模板, 使用引物对 PPK-f、PPK-r 克隆聚磷酸激酶编码基因 *ppk2*, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 获得约 800 bp 的目的基因条带 (实际大小为 810 bp), 大小与

预期相符 (图 2A)。目的基因 *ppk2* 与载体 pET29a 经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切后连接, 构建重组表达质粒 pET29a-*ppk2* 并转化克隆宿主。重组质粒双酶切验证产物经琼脂糖凝胶电泳分析可见约 810 bp 的目的基因片段和约 5 400 bp 的载体片段, 如图 2B 所示, 证明重组质粒已成功构建。

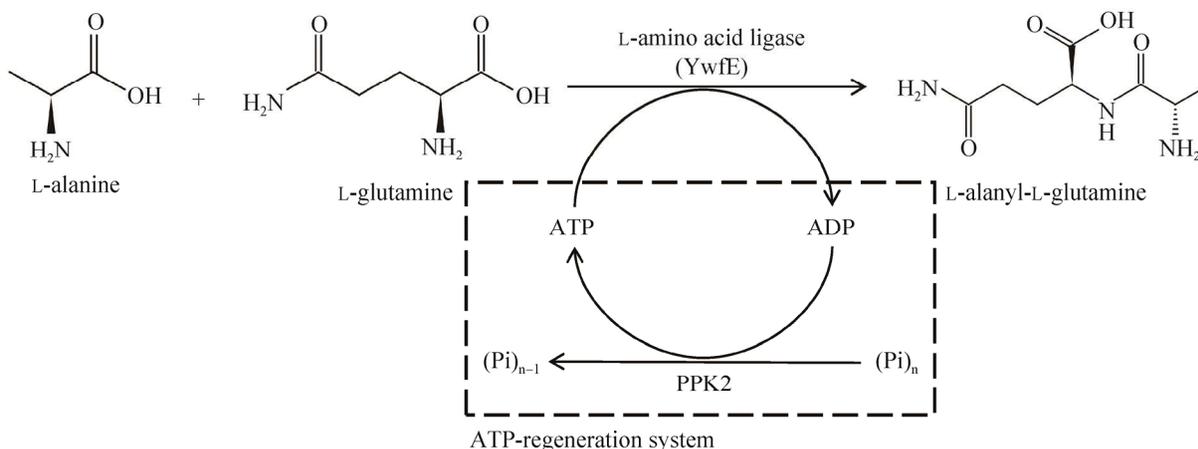


图 1 L-氨基酸连接酶 (YwfE) 与聚磷酸激酶 (PPK2) 联用合成 Ala-Gln 原理图

Figure 1 Schematic diagram of combined use of L-amino acid ligase (YwfE) and polyphosphate kinase (PPK2) for biosynthesis of Ala-Gln.

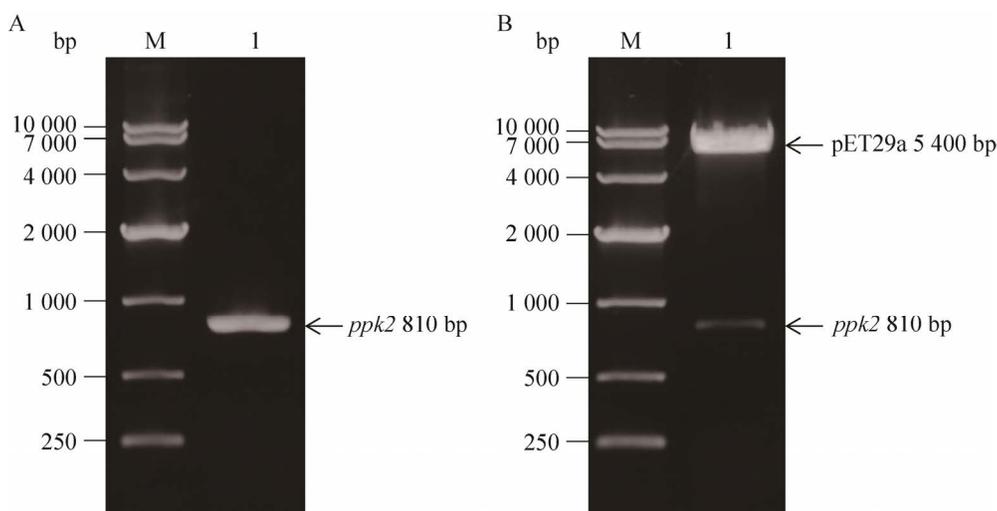


图 2 重组质粒 pET29a-*ppk2* 的构建

Figure 2 Construction of recombinant plasmid pET29A-PPK2. (A) PCR amplification of target gene *ppk2*. M: DNA marker DL10000, 1: gene *ppk2*. (B) Double enzyme digestion verification of recombinant plasmid pET29a-*ppk2*. M: DNA marker DL10000, 1: double enzyme digestion product of recombinant plasmid.

2.2 PPK2 蛋白的表达及表达条件优化

重组菌经过小瓶活化、摇瓶培养、诱导表达后,收集表达 PPK2 重组菌的全细胞、上清液和破碎沉淀进行 SDS-PAGE,发现大小约为 30 kDa 的目的蛋白 PPK2 (实际大小约为 29.7 kDa) 成功表达,并且主要存在于上清液中,说明蛋白以可溶状态存在,结果如图 3 所示。

为优化 PPK2 蛋白的表达条件,改变 PPK2 诱导时的温度 (16 °C、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C)、时间 (4、8、12、16、20 h)、诱导剂浓度 (0、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L),确定蛋白最适的诱导条件,结果如图 4 所示。诱导温度对于蛋白表达的影响不大,低温诱导表达量略高,诱导时间大于 12 h 后蛋白表达量几乎一致,没有诱导剂时蛋白不表达,当诱导剂浓度为 0.6 mmol/L 以上时蛋白表达效果最好,因此目的蛋白 PPK2 的最适表达条件为 16 °C 诱导 12 h,诱导剂浓度为 0.6 mmol/L。

2.3 PPK2 蛋白纯化

PPK2 的 C 端带有 His 标签,而且表达的蛋白以可溶状态存在于上清液中,因此采用非变

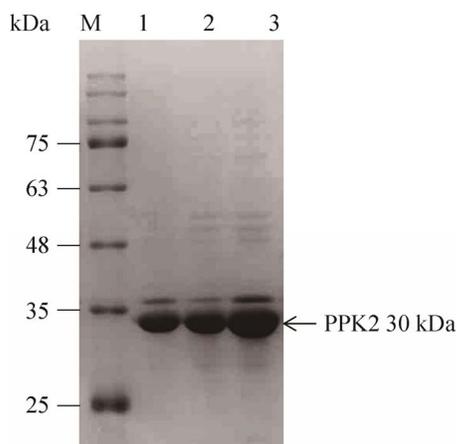


图 3 目的蛋白 PPK2 表达的 SDS-PAGE 分析
Figure 3 SDS-PAGE analysis of the expression of PPK2. M: protein marker; 1: cell fragmentation precipitation; 2: cell lysate; 3: whole cell.

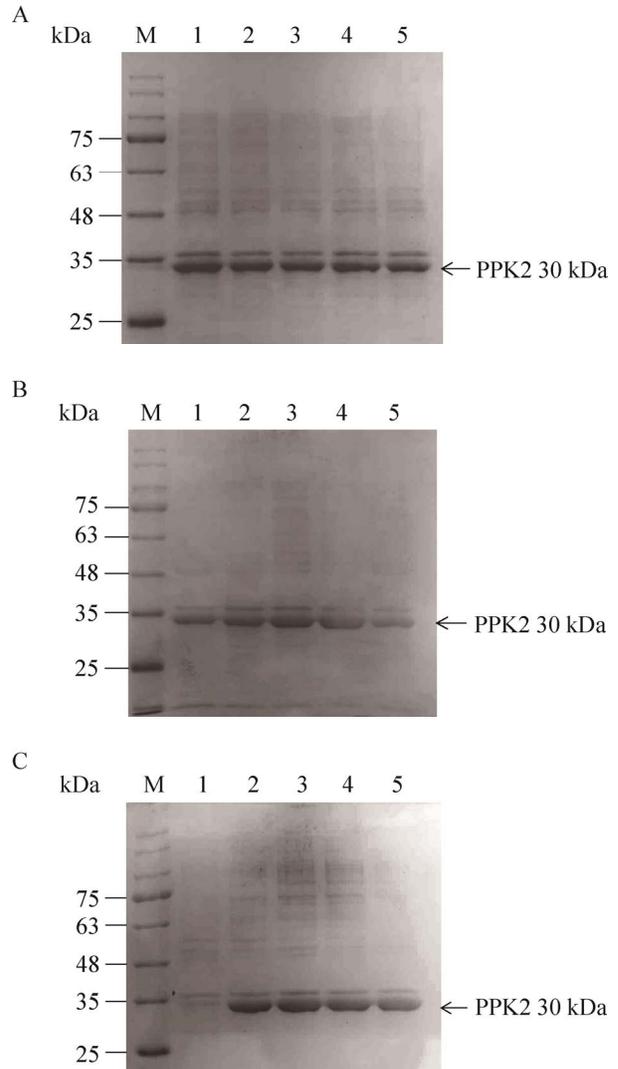


图 4 目的蛋白表达条件的优化

Figure 4 Optimization of the conditions of protein expression. (A) Effect of induction temperature on protein expression. M: protein marker; 1: 16 °C; 2: 20 °C; 3: 25 °C; 4: 30 °C; 5: 37 °C. (B) Effect of induction time on protein expression. M: protein marker; 1: 4 h; 2: 8 h; 3: 12 h; 4: 16 h; 5: 20 h. (C) Effect of inducer concentration on protein expression. M: protein marker; 1: 0 mmol/L; 2: 0.2 mmol/L; 3: 0.4 mmol/L; 4: 0.6 mmol/L; 5: 0.8 mmol/L.

性条件下金属螯合层析 (Ni^{2+}) 方法进行该蛋白的分离纯化,结果如图 5 所示,PPK2 蛋白纯化后经过 BCA 法测定,浓度为 1.2 mg/mL。

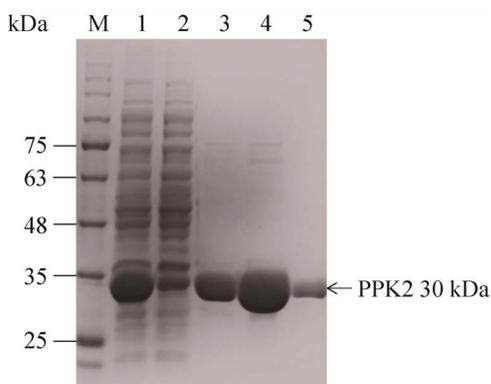


图5 目的蛋白PPK2的纯化

Figure 5 Purification of target protein PPK2. M: protein marker; 1: cell lysate; 2: retention of samples on purification column; 3: purified sample 1; 4: purified sample 2; 5: purified sample 3.

2.4 PPK2催化生成ATP的反应条件优化

PPK2的反应体系包括0.5 mg/mL PPK2, 10 mmol/L的ADP, 15 mmol/L的六偏磷酸钠, 30 mmol/L的 Mg^{2+} 的PBS缓冲液, 调整pH为8.0后, 于37 °C的水浴中反应3 h, 99 °C金属浴加热5 min终止反应, 恢复至室温后离心, 上清液进行高效液相色谱法分析, 测定ATP的浓度。为优化反应条件, 分别改变上述反应体系中的温度(22 °C、27 °C、32 °C、37 °C、42 °C)、pH(6、7、8、9、10)、 Mg^{2+} 浓度(0、10、20、30、40 mmol/L)和反应底物浓度(设置ADP与六偏磷酸钠浓度分别为: 5和10、5和20、10和15、10和20、15和30 mmol/L), 其他条件不变, 进行反应。磷酸供体三聚磷酸钠和六偏磷酸钠对ATP产率的影响也进行了考察, 结果如图6所示。温度为22–42 °C时, ATP产量均较高, 最适温度为37 °C(图6A); 当pH在7–10时ATP产量较高, 且无显著性差异, 其中最适pH为7(图6B); 没有 Mg^{2+} 时不发生反应, 随着 Mg^{2+} 浓度增加, ATP产量也在增加, 镁离子浓度为30 mmol/L比20 mmol/L时的ATP产量有显著提升, 镁离子

浓度为30、40 mmol/L左右时ATP产量最高(图6C)。为节约底物, 后续反应选择镁离子浓度为30 mmol/L; 如图6D所示, 该PPK2可以短链polyP为底物高效生成ATP, 反应0.5 h, ATP的产率就达到了理论值的60%以上, 以六偏磷酸钠为底物时ATP的产率约为三聚磷酸钠为底物时的3.5倍, 因此后续选择六偏磷酸钠作为磷酸供体; 由图6E–F可见, 当ADP与polyP的浓度分别为5和20 mmol/L时, ATP产量最高, 且具有显著性优势。

2.5 PPK2催化ATP生成的产率

以0.5 mg/mL PPK2为酶源, 以PBS作为缓冲液, ADP与六偏磷酸钠浓度分别为5 mmol/L和20 mmol/L时, 在最适温度为37 °C、pH为7的条件下反应, 结果如图7所示, ATP在反应0.5 h内产量快速升高, 在3 h左右产量达到峰值, 为3.55 mmol/L, 达到理论值的71.0%。

对PPK2的酶活性进行了测定, 以0.5 mg/mL PPK2为酶源, 以PBS作为缓冲液, 反应体系为8 mL, ADP与六偏磷酸钠浓度分别为10 mmol/L和15 mmol/L, 在温度为37 °C、pH为7的条件下反应10 min时, ATP产量可以达到4.98 mmol/L, 此时PPK2的酶比活达到了124.5 U/mg。

2.6 PPK2与YwfE联用生产二肽

近年来, 多酶级联的体外合成应用广泛^[23], 成功用于生产各种药物及化学品。为证明来源于*S. siyangensis* PPK2的适用性, 在体外利用L-氨基酸连接酶(YwfE)与聚磷酸激酶(PPK2)协同作用, 生产Ala-Gln。

以YwfE和PPK2纯酶为酶源, 反应体系为: 30 mmol/L的Ala, 60 mmol/L的Gln, 10 mmol/L的ADP, 15 mmol/L的六偏磷酸钠, 45 mmol/L的 Mg^{2+} , 保持两种酶浓度一致, 调整pH为8.0, 于27 °C的水浴中反应, 99 °C金属浴加热

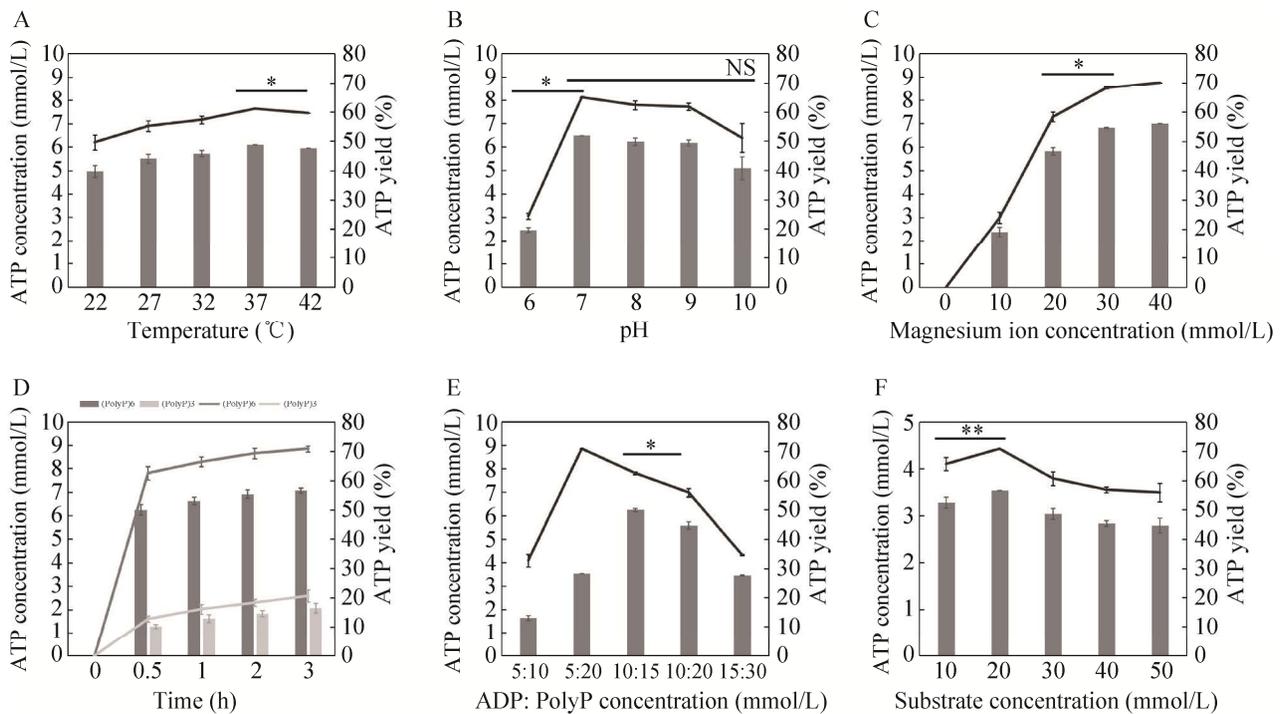


图 6 PPK2 催化 ATP 生成的反应条件优化

Figure 6 Optimization of reaction conditions for ATP production catalyzed by PPK2. (A) Effect of temperature. (B) Effect of pH. (C) Effect of magnesium ion. (D) Effect of phosphate donor in reaction substrate. (E) Effect of substrate concentration. (F) Effect of polyphosphate concentration. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

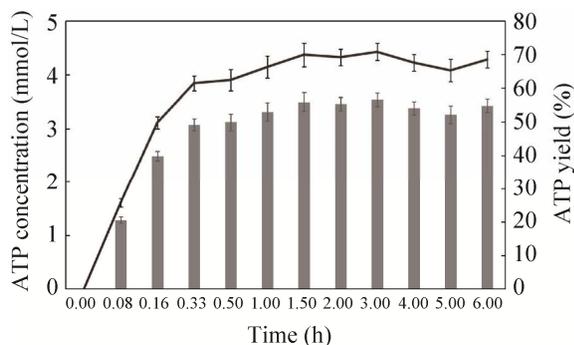


图 7 PPK2 催化 ATP 生成的产率

Figure 7 Yield of ATP catalyzed by PPK2.

5 min 终止反应。为优化反应条件, 分别调整 YwfE 和 PPK2 的酶浓度 (1:1、1:2、1:5、1:10)、两酶联用的时间 (PPK2 先反应 0、1、2、3、4 h 后再与 YwfE 联用)、两酶联用时 PPK2 的两种底物浓度 (5 和 10、5 和 20、10 和 15、10 和 20、15 和 30 mmol/L)、反应温度 (27、32、37 °C) 和反应体系 pH (6、7、8、9、10), 其他条件不变, 进行反应, 结果如图 8 所示。如图 8A 所示, 当 YwfE 和 PPK2 的浓度比为 1:5 时, Ala-Gln 产量显著高于酶浓度比为 1:2 时, 由图 8B, 可见 PPK2 先反应 3-4 h 后再与 YwfE 联用合成 Ala-Gln 时, 产物产量略有提高, 但整体看来无显著性差异, PPK2 的酶量多或者先开始反应都可以促进 ATP 的循环再生和积累, 从而推动 YwfE 催化生成 Ala-Gln; 如图 8C 可见, 在 YwfE 与 PPK2 两酶联用时, PPK2 的底物 ADP 和六偏磷酸钠的最适浓度分别为 10 和 15 mmol/L, 此时 Ala-Gln 的产量最高, 且显著高于底物浓度为 5 和 20 mmol/L、10 和 20 mmol/L 时的 Ala-Gln

和 15、10 和 20、15 和 30 mmol/L)、反应温度 (27、32、37 °C) 和反应体系 pH (6、7、8、9、10), 其他条件不变, 进行反应, 结果如图 8 所示。如图 8A 所示, 当 YwfE 和 PPK2 的浓度比为 1:5 时, Ala-Gln 产量显著高于酶浓度比为 1:2 时, 由图 8B, 可见 PPK2 先反应 3-4 h 后再与 YwfE 联用合成 Ala-Gln 时, 产物产量略有提高, 但整体看来无显著性差异, PPK2 的酶量多或者先开始反应都可以促进 ATP 的循环再生和积累, 从而推动 YwfE 催化生成 Ala-Gln; 如图 8C 可见, 在 YwfE 与 PPK2 两酶联用时, PPK2 的底物 ADP 和六偏磷酸钠的最适浓度分别为 10 和 15 mmol/L, 此时 Ala-Gln 的产量最高, 且显著高于底物浓度为 5 和 20 mmol/L、10 和 20 mmol/L 时的 Ala-Gln

产量；如图 8D 可见，两酶联用在 27–37 °C 均具有较好活性，温度为 27 °C 时，Ala-Gln 产量最高，显著高于 32 °C 时的产量；如图 8E 可见，两酶联用在 pH 为 7–8 时具有较好活性，其中 pH 为 8 时 Ala-Gln 产量最高。

综合以上结果，考察了优化条件下的双酶联用时 Ala-Gln 的产量。以 0.3 mg/mL YwfE 和 0.9 mg/mL PPK2 为酶源，反应体系为：30 mmol/L 的 Ala，60 mmol/L 的 Gln，10 mmol/L 的 ADP，15 mmol/L 的六偏磷酸钠，45 mmol/L 的 Mg^{2+} ，首先将 PPK2 加入反应体系，在 37 °C、pH 为 7 的条件下反应 3 h，之后将 YwfE 加入反应体系中，并且在温度为 27 °C、pH 为 8 的条件下反应，取样进行分析，

结果如图 9 所示，PPK2 和 YwfE 在 7 h 左右生成 Ala-Gln 的产量最高，为 19.23 mmol/L，产率达到理论值的 64.1%，与直接添加 ATP 相比，反应速率和 Ala-Gln 产量均有提高，且显著高于来源于 *E. coli* MG1655 的 PPK1 和 *Rhodobacter sphaeroides* 的 PPK2，后两种 PPK 与 YwfE 联用时，温度为 37 °C、pH 为 9.0 条件下产量最高，转化率分别为 45.0%、51.3% (转化率=反应消耗的 Gln 量/反应加入的 Gln 量 \times 100%)^[24]。

3 讨论

工业生产中，很多高附加值化学品的生产过程都会用到 ATP 依赖性的生物合成酶，而

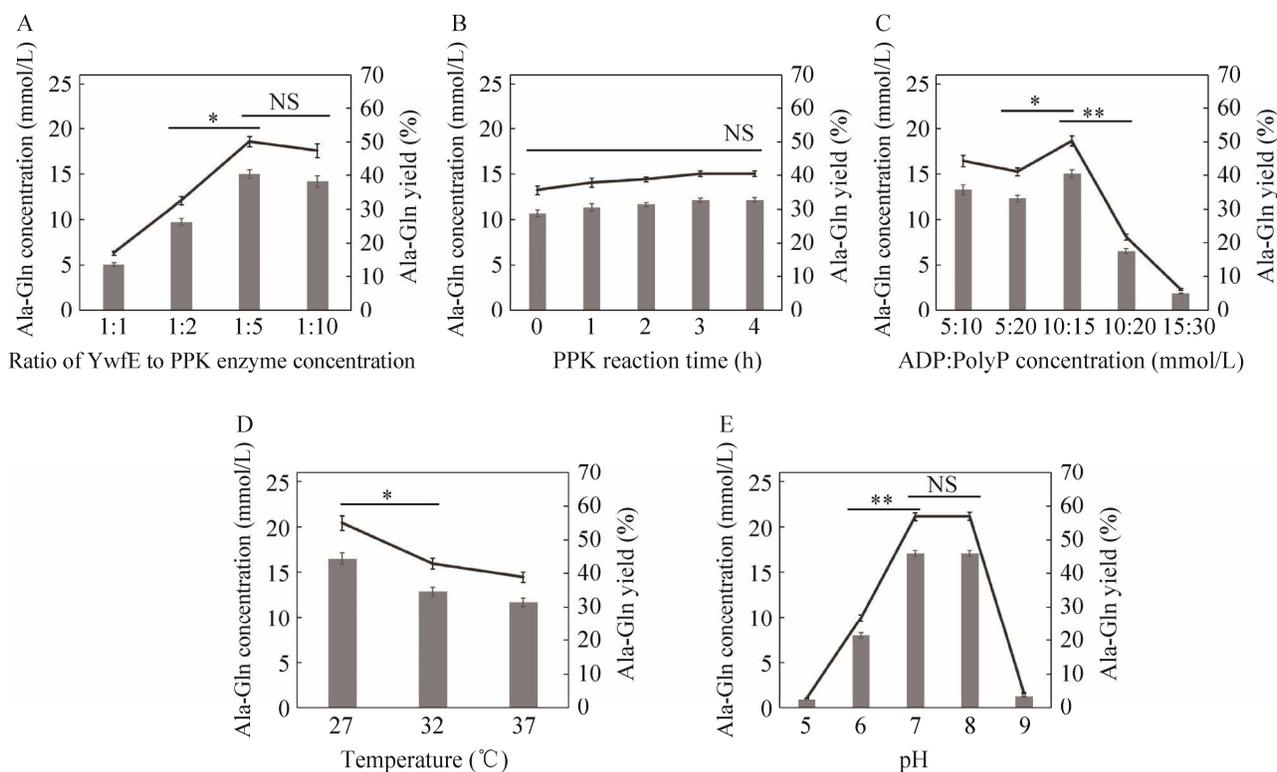


图 8 PPK2 与 YwfE 联用合成 Ala-gln 的反应条件优化

Figure 8 Optimization of reaction conditions for the synthesis of Ala-Gln by combine use of PPK2 and YwfE. (A) Effect of YwfE and PPK2 enzyme ratio. (B) Effect of PPK2 first reaction time. (C) Effect of substrate concentration. (D) Effect of temperature. (E) Effect of pH. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

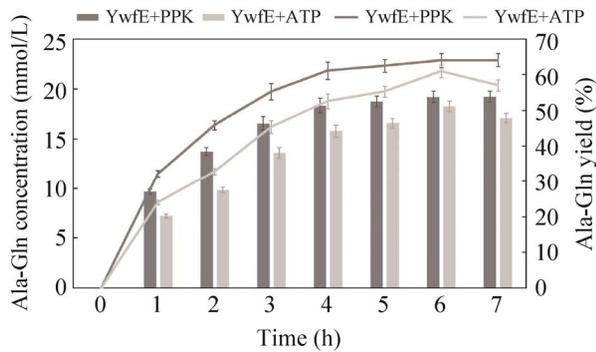


图9 PPK2与YwfE联用合成丙谷二肽

Figure 9 Ala-Gln synthesized by combined use of PPK2 and YwfE.

ATP 价格昂贵, 直接在反应中添加会大幅度提高反应成本, 不符合经济效益, 因此利用 ATP 再生系统循环产生 ATP 成为降低反应成本的一种有效方法。虽然文献曾报道丙酮酸激酶、乙酸激酶可用于 ATP 再生^[4], 但综合考虑底物是否廉价易得、反应是否方便且无副产物等因素, PPK 酶是更为合适的选择^[25]。而目前使用的 PPK 酶多为 PPK1, 以聚合度>10 的聚磷酸

盐为底物, 并且生成 ATP 的活性还不足。

本研究克隆并成功表达了来源于泗阳鞘氨醇杆菌的聚磷酸激酶 (PPK2), 通过与已报道 PPK 的酶活对比发现 (表 1), 发现本文中来源于 *S. siyangensis* 1.6855 的 PPK2 可以短链 polyP 为底物合成 ATP, 且在 22–42 °C、pH 为 7–10 时保持较好活性, 在最适条件下, PPK 的酶活达到了 124.5 U/mg, ATP 的产率达到了 71.0%, 是目前文献报道中蛋白质量最小、ATP 产率最高的聚磷酸激酶。并且该酶催化范围具有普适性, 可以适应较宽的反应温度和 pH 范围, 可与最适条件不同的 ATP 依赖酶偶联完成 ATP 的再生循环。在利用 PPK2 构成 ATP 再生系统与 L-氨基酸连接酶 (YwfE) 联用时, 可以催化 Ala-Gln 的生成, 且 Ala-Gln 产率与直接添加 ATP 相当, 高于其他来源的同类酶的生产效率 20%左右。本研究为功能性二肽的生产及其他种类的高附加值的活性物质的生产提供了很好的 ATP 循环系统的酶源。

表1 不同来源 PPK 对比

Table 1 Comparison of PPK from different sources

PPK type	Strain source	Protein size (kDa)	PolyP degree of polymerization	Maintain good enzyme activity		ADP conversion	Enzyme specific activity (U/mg)	References
				Temperature	pH			
PPK1	<i>Thermus thermophilus</i>	–	65.0	60.0–80.0	5.0–6.0	–	1.2×10^{-4}	[26]
PPK2	<i>Meiothermus ruber</i> NBRC 106122	31.6	65.0	60.0–72.0	7.0	–	2.7	[27]
PPK1	<i>E. coli</i> MG1655	77.0	6.0	42.0–48.0	7.5–8.5	15.4%	0.5	[24]
PPK2	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	38.2	6.0	42.0–48.0	7.5–8.5	20.1%	0.7	[24]
			3.0	–	–	–	No	
PPK2	Hydrogenophilaceae bacterium	44.0	6.0	25.0–35.0	6.0–7.0	–	189.0±13.0	[1]
PPK2	<i>Nocardioides dokdonensis</i>	41.0	6.0	25.0–35.0	6.0–7.0	–	124.0±20.0	[1]
PPK2	<i>Sphingobacterium siyangensis</i> (1.6855)	29.7	6.0	22.0–42.0	7.0–10.0	71.0%±2.6%	124.5±6.2	This study
			3.0	22.0–42.0	7.0–10.0	20.0%	–	

–: no such data in relevant literature.

REFERENCES

- [1] Zhang X, Cui XW, Li ZM. Characterization of two polyphosphate kinase 2 enzymes used for ATP synthesis. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 191(2): 881-892.
- [2] Wohlgemuth R, Liese A, Streit W. Biocatalytic phosphorylations of metabolites: past, present, and future. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(5): 452-465.
- [3] Langer RS, Hamilton BK, Gardner CR, et al. Enzymatic regeneration of ATP. I. Alternative routes. *AIChE J*, 1976, 22(6): 1079-1090.
- [4] Andexer JN, Richter M. Emerging enzymes for ATP regeneration in biocatalytic processes. *Chembiochem*, 2015, 16(3): 380-386.
- [5] Mukhopadhyay S, Hasson MS, Sanders DA. A continuous assay of acetate kinase activity: measurement of inorganic phosphate release generated by hydroxylaminolysis of acetyl phosphate. *Bioorg Chem*, 2008, 36(2): 65-69.
- [6] Crans DC, Kazlauskas RJ, Hirschbein BL, et al. Enzymatic regeneration of adenosine 5'-triphosphate: acetyl phosphate, phosphoenolpyruvate, methoxycarbonyl phosphate, dihydroxyacetone phosphate, 5-phospho-alpha-D-ribose pyrophosphate, uridine-5'-diphosphoglucose. *Methods Enzymol*, 1987, 136: 263-280.
- [7] Resnick SM, Zehnder AJ. *In vitro* ATP regeneration from polyphosphate and AMP by polyphosphate: amp phosphotransferase and adenylate kinase from *Acinetobacter johnsonii* 210A. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(5): 2045-2051.
- [8] Zhao HM, Van Der Donk WA. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(6): 583-589.
- [9] Sperl JM, Sieber V. Multienzyme cascade reactions—status and recent advances. *ACS Catal*, 2018, 8(3): 2385-2396.
- [10] Parnell AE, Mordhorst S, Kemper F, et al. Substrate recognition and mechanism revealed by ligand-bound polyphosphate kinase 2 structures. *PNAS*, 2018, 115(13): 3350-3355.
- [11] Mordhorst S, Singh J, Mohr MKF, et al. Several polyphosphate kinase 2 enzymes catalyse the production of adenosine 5'-polyphosphates. *Chembiochem*, 2019, 20(8): 1019-1022.
- [12] Eltoukhy L, Loderer C. A multi-enzyme cascade for the biosynthesis of AICA ribonucleoside di- and triphosphate. *Chembiochem*, 2022, 23(3): e202100596.
- [13] Tavanti M, Hosford J, Lloyd RC, et al. ATP regeneration by a single polyphosphate kinase powers multigram-scale aldehyde synthesis *in vitro*. *Green Chem*, 2021, 23(2): 828-837.
- [14] Nocek B, Kochinyan S, Proudfoot M, et al. Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *PNAS*, 2008, 105(46): 17730-17735.
- [15] 张星, 崔向伟, 李宗霖, 等. 基于能量循环再生系统酶法生产谷胱甘肽. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2020, 46(5): 688-693.
Zhang X, Cui XW, Li ZL, et al. Enzymatic synthesis of glutathione based on energy regeneration system. *J East China Univ (Sci Technol Ed)*, 2020, 46(5): 688-693 (in Chinese).
- [16] Kim JE, Zhang YH. Biosynthesis of D-xylulose 5-phosphate from D-xylose and polyphosphate through a minimized two-enzyme cascade. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(2): 275-282.
- [17] 李元, 刘珊, 祝俊. PPK 和 GMAS 共表达重组菌株的构建及其在 L-茶氨酸合成中的应用. *生物工程学报*, 2016, 32(12): 1745-1749.
Li Y, Liu S, Zhu J. Construction of recombinant strains co-expressing PPK and GMAS for the synthesis of L-theanine. *Chin J Biotech*, 2016, 32(12): 1745-1749.
- [18] Li ZL, Sun CQ, Lou LW, et al. A cocktail of protein engineering strategies: breaking the enzyme bottleneck one by one for high UTP production *in vitro*. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 119(6): 1405-1415.
- [19] Tsuda T, Asami M, Koguchi Y, et al. Single mutation alters the substrate specificity of L-amino acid ligase. *Biochemistry*, 2014, 53(16): 2650-2660.
- [20] Wang J, Li YF, Qi YL. Effect of glutamine-enriched nutritional support on intestinal mucosal barrier function, MMP-2, MMP-9 and immune function in patients with advanced gastric cancer during perioperative chemotherapy. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3606-3610.
- [21] Wang ZE, Wu D, Zheng LW, et al. Effects of glutamine

- on intestinal mucus barrier after burn injury. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11): 3833-3846.
- [22] Li YM, Yuan WJ, Gao JQ, et al. Production of L-alanyl-L-glutamine by recycling *E. coli* expressing α -amino acid ester acyltransferase. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1603-1609.
- [23] Liu R, Yu DC, Deng ZX, et al. Harnessing *in vitro* platforms for natural product research: *in vitro* driven rational engineering and mining (iDREAM). *Curr Opin Biotechnol*, 2021, 69: 1-9.
- [24] 洪翔. 酶法催化合成 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018.
Hong X. Study on the synthesis of L-alanyl-L-glutamine using enzymatic method[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2018 (in Chinese).
- [25] Shiba T, Tsutsumi K, Ishige K, et al. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Mosc)*, 2000, 65(3): 315-323.
- [26] Iwamoto S, Motomura K, Shinoda Y, et al. Use of an *Escherichia coli* recombinant producing thermostable polyphosphate kinase as an ATP regenerator to produce fructose 1,6-diphosphate. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(17): 5676-5678.
- [27] Motomura K, Hirota R, Okada M, et al. A new subfamily of polyphosphate kinase 2 (class III PPK₂) catalyzes both nucleoside monophosphate phosphorylation and nucleoside diphosphate phosphorylation. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(8): 2602-2608.

(本文责编 郝丽芳)