

## 基于葡萄糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 NADPH 高效再生

于平, 杨柳贞, 马健, 张琪立, 陈庆伟  
(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

**摘要** 目的:构建辅酶 NADPH 高效再生的基因工程菌,获得辅酶 NADPH 高效再生的最佳工艺条件。方法:利用基因工程技术将辅酶 NADPH 再生关键酶的基因 *glk* 和 *zwf* 导入到大肠杆菌 BL21 中,实现辅酶 NADPH 循环高效再生,并优化辅酶 NADPH 再生的工艺条件。结果:成功构建了含有辅酶 NADPH 再生关键酶两个基因的重组大肠杆菌 BL21/pETDuet-1-*glk-zwf*;通过正交设计优化试验,获得重组工程菌株产辅酶 NADPH 的最佳工艺条件是:诱导温度 20 °C、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷浓度 0.25 mmol/L、接种量 1.5%、装液量 100 mL/250 mL。在此条件下进行 1 L 发酵摇瓶诱导培养 48 h,辅酶 NADPH 产量高达 151.79  $\mu$ mol/L。结论:研究结果为辅酶 NADPH 循环再生提供了良好的理论基础。

**关键词** 葡萄糖激酶;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;辅酶 NADPH 高效再生;正交试验优化

**文章编号** 1009-7848(2022)08-0163-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.08.018

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸,又称还原型辅酶 II(NADPH),在细胞合成代谢中作为供氢体提供还原力参与酶促反应<sup>[1]</sup>,然而,目前在工业生物催化应用研究中,通常需人为添加外源辅酶 NADPH 以完成催化反应。由于 NADPH 是一种昂贵、稳定性差、难以重复利用的试剂,通过不断添加外源辅酶 NADPH 会导致成本高昂且效率低,因此构建辅酶 NADPH 再生系统,对于经济、高效的生物催化氧化工艺至关重要。辅酶再生的基本原理是氧化态的辅酶 NADP<sup>+</sup>通过氧化-还原反应转化为还原态辅酶 NADPH,实现辅酶 NADPH 原位再生<sup>[2-3]</sup>。经过科研工作者们不懈的努力,建立了很多辅酶 NADPH 的再生方法,如电化学法、光化学法、化学法原位再生、酶法再生以及构建辅酶循环再生系统,改造辅酶合成途径,调控辅酶再生代谢途径,寻找辅酶替代物等<sup>[4]</sup>。生物细胞内代谢是酶制备与酶催化最有效的过程<sup>[5-6]</sup>。生物细胞内含有多种酶和辅酶,其代谢系统具有一定的协调性和稳定性,利用细胞内的代谢途径和关键酶实现辅酶 NADPH 胞内再生是一条重要的途径<sup>[7]</sup>。通常使用基因工程技术,将辅酶 NADPH 再生关键酶基因导入工程菌进行表达,实现辅酶胞内高效再生<sup>[8]</sup>。

目前广泛应用的微生物细胞内 NADPH 的合成代谢途径主要包括 4 类:戊糖磷酸途径(PPP 途径)、糖酵解途径(EMP 途径)、酒精发酵途径(ED 途径)和三羧酸循环(TCA 循环)等<sup>[9]</sup>。在这些合成代谢途径中所涉及的一些酶属于合成 NADPH 的关键酶,将其运用于代谢工程中可增加 NADPH 的利用率并增强生物转化过程。Spaans 等<sup>[10]</sup>综述了细菌和古生菌代谢途径中辅酶 NADPH 再生的关键酶:1)参与中心碳代谢反应,包括 PPP 途径和 ED 途径的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGDH),TCA 循环的异柠檬酸脱氢酶(IDH)和苹果酸酶(ME),EMP 途径的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPN)和葡萄糖脱氢酶(GDH);2)参与非中心碳代谢反应,包括能量非依赖性可溶性转氢酶(STH),依赖于能量或质子转移的膜结合转氢酶(H<sup>+</sup>-TH),铁氧还蛋白-NADP<sup>+</sup>氧化-还原酶,胞质 NADP<sup>+</sup>还原氢化酶(SH)以及 NAD<sup>+</sup>激酶(NADK)。郑雅楠等<sup>[11]</sup>构建了己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶共表达的大肠杆菌,以葡萄糖为底物实现了辅酶 NADPH 的高效再生,并将辅酶再生体系与醇脱氢酶 AdhR 联合催化,使不对称还原 4-氯乙酰乙酸乙酯的催化活力提高至原始值的 2.5 倍。Pham 等<sup>[12]</sup>构建重组大肠杆菌 P450pyrTM-GDH,可通过辅因子循环进行 P450 催化的羟化反应,并且也将 GDH 与多组分 P450 单加氧酶共表达以增强氧化作用。将全细胞作为生物催化剂,可通过 NADPH 的细胞内再循环提

收稿日期:2021-08-09

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY21C200006)

通信作者:于平(1974—),男,博士,教授

E-mail: yup9202@hotmail.com

高脂环族底物在非活化碳原子上的高度区域和立体选择性羟基化,提高生产率<sup>[13]</sup>。Poulsen 等<sup>[14]</sup>在黑曲霉(*Aspergillus niger*)内过量表达 PPP 中的关键酶 G6PDH、6PGDH 和转酮醇酶(TKT),培养野生型和工程菌株。结果表明,过量表达 6PGDH 使内源性 NADPH 浓度增加 2~9 倍。Lim 等<sup>[15]</sup>分别将编码 G6PDH 与 6PGDH 的基因 *zwf* 和 *gnd* 导入大肠杆菌中进行表达,结果发现与编码 6PGDH 的基因 *gnd* 相比,编码 G6PDH 的基因 *zwf* 将 NADPH 的水平提高了 3 倍,使得内源性 NADPH/NADP<sup>+</sup>的比例提高了 6 倍。

本研究主要利用基因工程技术,将合成 NADPH 的关键酶基因即葡萄糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因(*glk-zwf*)构建到大肠杆菌 BL21 (DE3)中,实现辅酶 NADPH 高效循环再生,并探究异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)浓度、诱导温度、接种量、装液量对辅酶 NADPH 再生的影响;通过正交设计优化试验,探讨重组菌株产辅酶 NADPH 的最佳工艺条件,为实现工业化生产辅酶 NADPH 提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌 K12(*Escherichia coli* K12)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (*E. coli* DH5 $\alpha$ )、大肠杆菌 BL21(*E. coli* BL21)和质粒 pETDuet-1 均来源于实验室保存的菌株。

1.1.2 主要试剂 蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、氨苄青霉素、琼脂粉、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、蛋白电泳上样缓冲液、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸(Glycine)、十二烷基硫酸钠(SDS)、硼酸、EDTA 二钠等购自上海生工生物有限公司;基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、核酸胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、大肠杆菌感受态制备试剂盒、DNA 聚合酶(PrimeSTAR Max DNA Polymerase)、限制性核酸内切酶(*Nde*I、*Xho*I)、T<sub>4</sub>连接酶、DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker 等购自大连 Takara 宝生物工程有限公司。

1.1.3 仪器与设备 PCR 仪,德国 EPPENDORF 公司;凝胶成像分析系统,美国 BIO-RAD 公司;LRH-250 生化培养箱,上海领仪科技有限公司;

SKY-200B 台式恒温振荡器,上海苏坤实业有限公司;YXQ-LS-50SII 高压灭菌锅,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;TGL-16G 高速冷冻离心机,广州卢瑞明仪器有限公司;Agilent 1100 高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司。

### 1.1.4 培养基与试剂配制

1.1.4.1 LB 培养基 蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L,pH 7.0~7.2,121 °C,灭菌 20 min。

1.1.4.2 标准品 NADPH 母液 准确称取 0.0050 g NADPH 到小烧杯中,用超纯水定容到 10 mL 容量瓶中,即得 600  $\mu$ mol/L NADPH 母液,-20 °C 冰箱保存。

1.1.4.3 考马斯亮蓝染色液 准确称取 0.5 g 考马斯亮蓝 R-250 置于 1 L 大烧杯中,依次加入 225 mL 甲醇、225 mL 蒸馏水和 50 mL 冰醋酸,混匀。

1.1.4.4 脱色液 300 mL 甲醇、600 mL 蒸馏水、100 mL 冰醋酸,混匀,常温放置。

## 1.2 试验方法

1.2.1 葡萄糖激酶基因(*glk*)与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因(*zwf*)的克隆 以大肠杆菌 K12 基因组为模板,在 50  $\mu$ L 体系中分别进行 PCR 扩增 *glk* 与 *zwf* 目的基因片段。PCR 扩增体系:大肠杆菌 K12 基因组 1  $\mu$ L,上下游引物各 1.5  $\mu$ L,高保真酶混合液(PrimeSTAR Max Polymerase)25  $\mu$ L,无菌蒸馏水 21  $\mu$ L。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 30 s,退火 15 s,72 °C 延伸 15 s,30 个循环;72 °C 进一步延伸 10 min;4 °C 保存。设定 *glk* 基因退火温度为 55 °C,*zwf* 基因退火温度为 56 °C。将 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。本试验中采用重叠延伸 PCR 技术获得包含 2 个目的基因 *glk* 和 *zwf* 序列的全长 PCR 产物(*glk-zwf*)。将割胶回收纯化后的 *glk* 和 *zwf* 基因片段各取 1  $\mu$ L 共同作为模板,以 *glk*-F 和 *zwf*-R 各 1.5  $\mu$ L 作为引物,高保真酶混合液 25  $\mu$ L,无菌蒸馏水 21  $\mu$ L。重叠延伸反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,68 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2.5 min,循环 2 次后退火温度降 2 °C 再延伸,以此类推,直到设定退火温度为 58 °C;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。将 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,把目的基因片段(*glk-zwf*)大小为 2 442 bp 的条带进行割胶回收纯化。

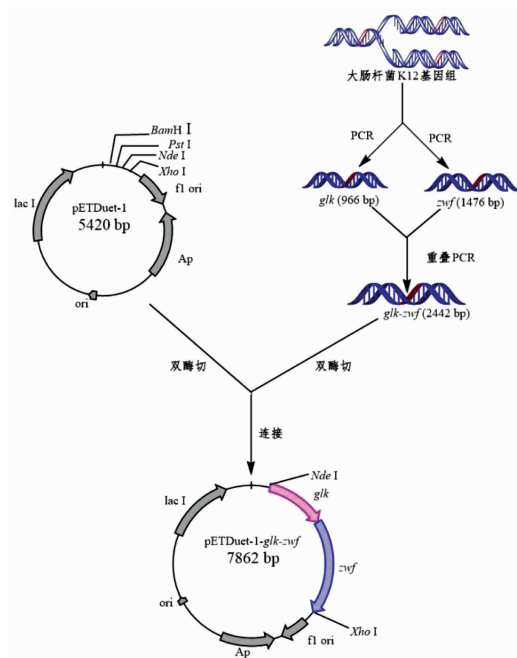
表 1 葡萄糖激酶基因 (*glk*) 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 (*zwf*) 克隆所用的引物序列Table 1 Primer sequences used in the cloning of the genes *glk* and *zwf*

引物名称	引物序列	预期基因大小/bp
<i>glk</i> -F	5'-CCAGCATATGACAAAGTATGCATTAGTCGGTGATGTGGCGGCACCAACGCACG TCTTG-3'	966
<i>glk</i> -R	5'-GCTGTTTTCGTTACCGCCATGGTATATCTCCTTCTTAATTACAGAATGTGACCTAA GGT-3'	
<i>zwf</i> -F	5'-ACCTTAGGTCACATTCTGTAATTAAGAAGGAGATATACCATGGCGGTAACGCAAAC AGC-3'	1 476
<i>zwf</i> -R	5'-AAGACTCGAGTTACTCAAACCTCATTCCAGGAACGACCATCACGGGTAATCATCGCC AC-3'	

注: *glk*-F 与 *zwf*-R 酶切位点分别为 *Nde*I 和 *Xho*I, 下划线表示酶切位点。

1.2.2 重组质粒 pETDuet-1-*glk-zwf* 的构建 将获得的基因片段 (*glk-zwf*) 和质粒 pETDuet-1, 分别用 *Nde*I 和 *Xho*I 进行双酶切, 酶切温度为 37 °C, 时间 6 h。酶切结束后进行回收纯化, 双酶切产物用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接, 连接温度 16 °C, 时间 14 h。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 挑取氨苄青霉素抗性平板上的单菌落于液体 LB 培养基 (含 100  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素) 培养过夜, 提取质粒, 进行质粒大小验证、双酶切验证以及 PCR 验证, 再进一步送到上海生工测序验证, 从而筛选得到重组质粒 pETDuet-1-*glk-zwf*。按照 TaKara 大肠杆菌感受态制备试剂盒说明书制备感受态细胞, 酶切产物纯化和质粒提取参照 Takara 公司的 PCR 产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒。重组质粒构建流程图如下图 1 所示。

1.2.3 重组菌株诱导表达 分别将质粒 pETDuet-1 和重组质粒 pETDuet-1-*glk-zwf* 导入到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 得到重组菌株大肠杆菌 BL21/pETDuet-1 和重组表达菌株大肠杆菌 BL21/pETDuet-1-*glk-zwf*。按 1% 接种量接种原始菌株大肠杆菌 BL21 和构建好的重组菌大肠杆菌 BL21/pETDuet-1、大肠杆菌 BL21/pETDuet-1-*glk-zwf* 于 10 mL LB 液体培养基 (含 100  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素) 中, 37 °C、180 r/min 摇床振荡培养 16 h。再按 1% 接种量转接至装液量为 50 mL/250 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 摇床振荡培养至 OD<sub>600nm</sub> 为 0.6~0.8 时, 向培养基中加入 0.1 mmol/L 的 IPTG, 28 °C 低温继续诱导培养 24 h 后收集菌体。

图 1 重组质粒 pETDuet-1-*glk-zwf* 构建流程图Fig.1 Flow chart of the construction of recombinant plasmid pETDuet-1-*glk-zwf*

1.2.4 细胞超声破碎 取诱导培养后的菌液, 在 8 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 去掉上清液, 收集菌体。加入磷酸缓冲液重悬, 置于超声破碎仪器中进行细胞破碎, 150 W 工作 5 s, 停止 5 s, 重复 90 次。破碎后的菌液在 8 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 收集上清液和沉淀重悬液进行 SDS-PAGE 分析。蛋白凝胶电泳使用 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色, 然后用脱色液进行脱色, 凝胶成像仪观察电泳情况。

1.2.5 IPTG 浓度对 NADPH 再生的影响 设置 IPTG 浓度分别为 0.05,0.15,0.25,0.35,0.45 mmol/L;按 1%接种量接种于 50 mL/250 mL LB 发酵培养基,诱导温度 24 ℃,诱导 24 h。

1.2.6 诱导温度对 NADPH 再生的影响 设置诱导温度分别为 16,20,24,28,37 ℃,选取 IPTG 诱导浓度为 0.15 mmol/L,按 1%接种量接种至 50 mL/250 mL LB 发酵培养基,诱导 24 h。

1.2.7 接种量对 NADPH 再生的影响 分别设置 1%,2%,3%,4%,5%接种量接种于 50 mL/250 mL LB 发酵培养基,选取 IPTG 诱导浓度 0.15 mmol/L,诱导温度 24 ℃,诱导 24 h。

1.2.8 装液量对 NADPH 再生的影响 在 250

mL 的三角锥形瓶中设置装液量为 25,50,75,100,125 mL LB 发酵培养基,选取 IPTG 诱导浓度 0.15 mmol/L,诱导温度 24 ℃,1%接种量,诱导 24 h。

1.2.9 正交试验优化辅酶 NADPH 再生的培养条件 根据上述单因素实验确定诱导温度、IPTG 浓度、接种量、装液量的最佳取值范围,进一步采用 SPSS 软件设计四因素三水平的正交试验,以诱导温度(A)、IPTG 浓度(B)、接种量(C)、装液量(D)作为正交试验的自变量,以辅酶 NADPH 产量作为因变量,以 1、2、3 作为 4 个自变量因素水平的编码,正交试验因素与水平的设计如表 2 所示。

表 2 正交试验因素与水平的设计

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	诱导温度(A)/℃	IPTG 浓度(B)/mmol·L <sup>-1</sup>	接种量(C)/%	装液量(D)/mL·(250 mL) <sup>-1</sup>
1	20	0.05	0.5	50
2	24	0.15	1.0	75
3	28	0.25	1.5	100

1.2.10 诱导时间对辅酶 NADPH 再生的影响 诱导时间的长短直接关系到辅酶 NADPH 最终合成量的高低。基于 1.2.9 节正交试验优化好的培养条件,按照 1.5%的接种量接种重组大肠杆菌,装液量为 100 mL/250 mL,IPTG 浓度 0.25 mmol/L,诱导 72 h,每隔一定时间进行取样测定 NADPH 的产量,探究不同诱导时间对 NADPH 产量的影响。

### 1.3 辅酶 NADPH 产量测定方法

采用高效液相色谱法(HPLC)检测细胞破碎离心后上清液中的辅酶 NADPH 产量,检测条件为:色谱柱:Waters Atlantis T3(3.0 mm×150 mm,3 μm);流动相:20 mmol/L 磷酸钾缓冲液,pH=7.3;进样量:5 μL,柱温:30 ℃;检测波长:340 nm;流速:0.4 mL/min,运行时间 15 min。

### 1.4 统计分析

试验数据的统计分析采用 SPSS 17.0 软件,绘图采用 Origin 8.5 软件。

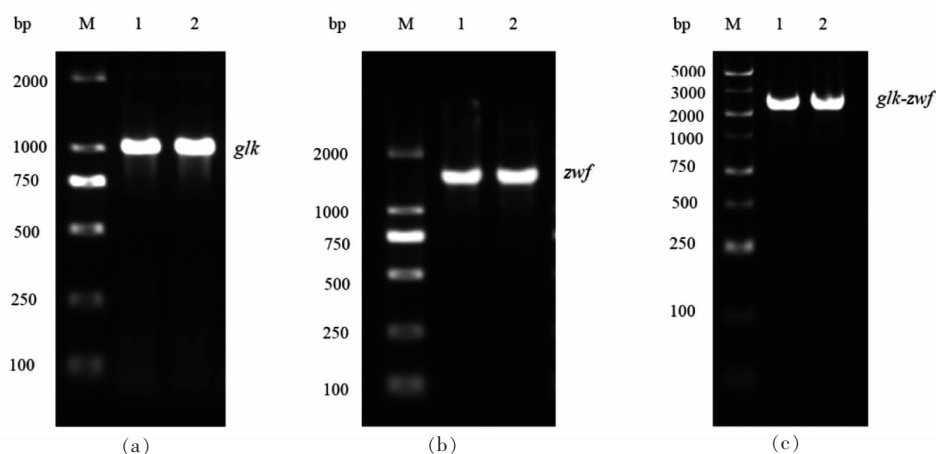
## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因 *glk* 和 *zwf* 的扩增与重组质粒的鉴定

以大肠杆菌 K12 基因组为模板,进行葡萄糖

激酶基因(*glk*)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因(*zwf*)的 PCR 扩增,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 所示。图 2a 目的基因片段 *glk* 大小为 966 bp,图 2b 目的基因片段 *zwf* 大小为 1 476 bp,泳道 1 和 2 中的基因条带与目的基因片段大小符合。以 *glk* 基因和 *zwf* 基因为模板,经重叠延伸 PCR 扩增,结果如图 2c 所示,目的基因片段 *glk-zwf* 理论大小为 2 442 bp,泳道 1 和 2 中的基因条带与目的基因片段大小符合。

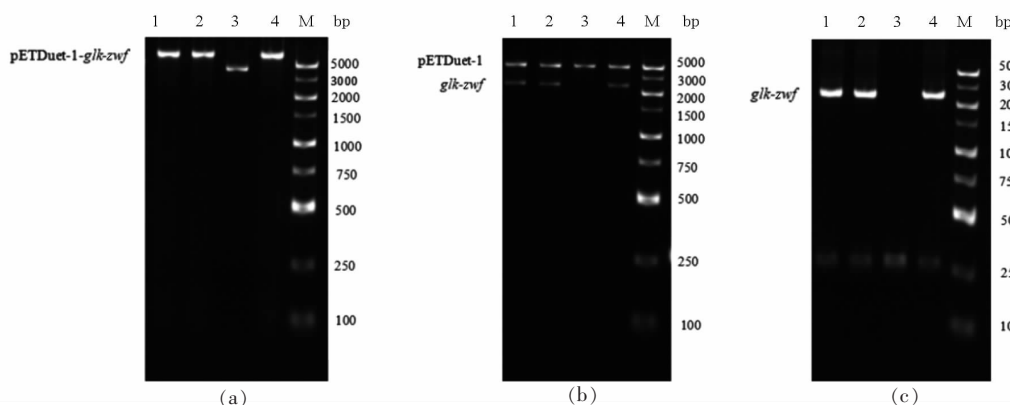
随机挑取抗性平板上长出的 4 个单菌落至 LB 培养基中(含 100 μg/mL 的氨苄青霉素),37 ℃、180 r/min 摇床振荡过夜培养 24 h,提取质粒并分别命名为 P1、P2、P3 和 P4。分别以质粒 P1、P2、P3 和 P4 为模板,进行重叠延伸 PCR 扩增,结果如图 3 所示。重组质粒 pETDuet-1-*glk-zwf* 的大小为 7 862 bp,可初步判断质粒 P1、P2 和 P4 为阳性克隆。挑选 P1 进行测序,通过 Blast 比对分析发现,重组质粒 P1 中的外源基因片段与 NCBI 数据库公布的 *glk-zwf* 序列比对结果均为 100%,说明重组质粒 pETDuet-1-*glk-zwf* 构建成功。



注:(a)和(b)中 M 为 DL2000 marker,(c)中 M 为 DL5000 marker;泳道 1 和 2 为 PCR 产物。

图 2 *glk* 和 *zwf* 基因电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis map of *glk* and *zwf* genes



注:泳道 M 为 5 000 bp Marker;泳道 1、2、3、4 分别对应质粒 P1、P2、P3、P4。

图 3 质粒大小鉴定(a)、双酶切鉴定(b)和重叠延伸 PCR 鉴定电泳图(c)

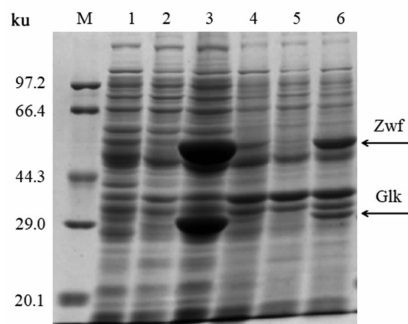
Fig.3 Electrophoresis diagram of plasmid size identification (a), double enzyme digestion identification (b) and overlap PCR identification (c)

## 2.2 重组菌株的 SDS-PAGE 分析

重组菌株大肠杆菌 BL21/pETDuet-1-*glk-zwf* 经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4 所示。泳道 3 蛋白电泳条带大小分别接近 54.0 ku 和 35.0 ku,与理论值一致,可见重组菌株实现了可溶性表达。

## 2.3 NADPH 标准曲线的绘制

配制了不同浓度的 NADPH 标准溶液,用 HPLC 法进行检测,将峰面积作为纵坐标,NADPH 浓度作为横坐标,进行线性拟合,绘制标准曲线,结果如图 5 所示。标准溶液 NADPH 的线性回归方程为  $y = 2.5104x - 15.75936$ ,相关系数为  $R^2 = 0.99679$ ,显示线性拟合良好。



注:M. 蛋白 marker;1. 大肠杆菌 BL21 细胞破碎上清液;2. 大肠杆菌 BL21/pETDuet-1 细胞破碎上清液;3. 大肠杆菌 BL21/pETDuet-1-*glk-zwf* 细胞破碎上清液;4. 大肠杆菌 BL21 细胞破碎沉淀重悬液;5. 大肠杆菌 BL21/pETDuet-1 细胞破碎沉淀重悬液;6. 大肠杆菌 BL21/pETDuet-1-*glk-zwf* 细胞破碎沉淀重悬液。

图 4 SDS-PAGE 蛋白电泳结果

Fig.4 Results of SDS-PAGE protein electrophoresis

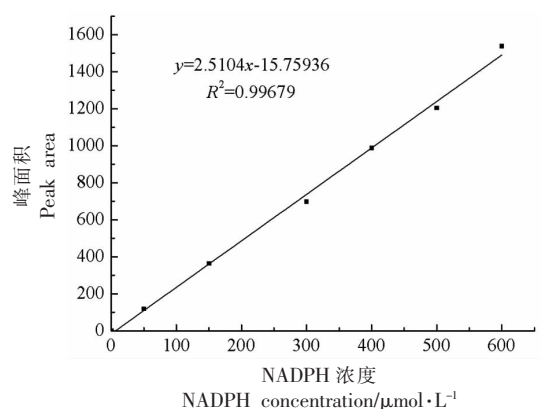


图5 NADPH浓度标准曲线

Fig.5 Standard curve of NADPH concentration

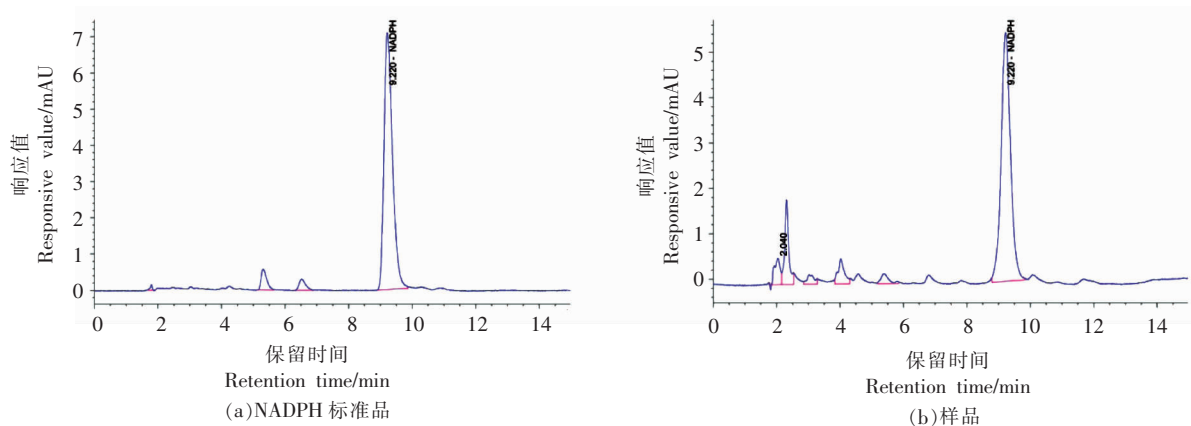


图6 标准品和样品中NADPH的HPLC检测图谱

Fig.6 High performance liquid chromatogram of NADPH in standard and sample

## 2.5 IPTG浓度对辅酶NADPH再生的影响

由图7a可知,IPTG浓度在0.05~0.15 mmol/L之间,NADPH产量变化不大,当发酵培养基体系中所含IPTG浓度为0.15 mmol/L时,辅酶NADPH产量达到最高,此时辅酶最高产量为81.05  $\mu\text{mol/L}$ ;然而随着IPTG浓度的继续增大,辅酶产量下降明显,特别是IPTG浓度为0.45 mmol/L时,重组细胞遭到IPTG毒性的影响,菌体生长受到抑制,生长量低,对重组工程菌株合成辅酶NADPH造成了严重的影响,故选择0.15 mmol/L作为重组菌株的最佳IPTG诱导浓度。

## 2.6 诱导温度对辅酶NADPH再生的影响

由图7b可知,不同诱导温度对辅酶NADPH产量产生了显著影响,随着诱导温度的升高,辅酶NADPH产量显著上升,当诱导温度为24  $^{\circ}\text{C}$ 时,辅酶NADPH产量最高,此时产量为115.93  $\mu\text{mol/L}$ ,

## 2.4 HPLC法测定重组大肠杆菌中辅酶NADPH再生的能力

为了验证所构建的重组大肠杆菌BL21/pET-Duet-1-*glk-zwf*是否具有辅酶NADPH再生的能力,对重组菌株进行IPTG诱导表达,收集菌体,进行细胞破碎,取破碎上清液通过HPLC法检测重组菌株中辅酶NADPH再生的能力。标准品NADPH的保留时间为9.220 min(图6a);样品NADPH的保留时间为9.220 min(图6b),与标准品NADPH的保留时间一致,由此推断出重组菌株具有辅酶NADPH再生的能力。

然而随着诱导温度的继续上升,辅酶NADPH产量呈现下降趋势,并且当诱导温度达到32  $^{\circ}\text{C}$ 时,HPLC无法检测到辅酶NADPH,说明高温不利于重组工程菌中辅酶NADPH的合成。综上,选择24  $^{\circ}\text{C}$ 作为重组大肠杆菌BL21/pETDuet-1-*glk-zwf*最佳诱导温度。

## 2.7 接种量对辅酶NADPH再生的影响

接种量与重组菌株生长量有着密切关系,进而影响到NADPH的再生。通过在发酵培养基体系中添加不同接种量,来探究接种量对辅酶NADPH再生的影响,结果如图7c所示。不同接种量对辅酶NADPH产生了显著影响,辅酶NADPH再生产量随着接种量的逐渐升高而明显降低,当接种量为1%时,NADPH产量达到最高(118.75  $\mu\text{mol/L}$ ),由此推断可能因为接种量过高导致初期菌体生长量过高,发酵培养基营养物质消耗过快,

从而导致辅酶 NADPH 产量不高。综上,选择 1% 为最佳接种量。

## 2.8 装液量对辅酶 NADPH 再生的影响

装液量与发酵过程中的溶氧量有关,通过在同一个发酵瓶中添加不同体积 LB 发酵培养基,探究不同装液量对辅酶 NADPH 再生的影响,结果如图 7d 所示。不同装液量对辅酶 NADPH 产生了显

著影响,装液量过低,虽然摇瓶中溶氧量高,但是菌体生长过于旺盛,反而不利于目的产物的合成,此时辅酶产量只有 27.20  $\mu\text{mol/L}$ ;当装液量为 125 mL/250 mL,产量最高为 136.15  $\mu\text{mol/L}$ ,而当摇瓶中装液量 75 mL/250 mL 辅酶 NADPH 产量可达 134.67  $\mu\text{mol/L}$ ,两者辅酶 NADPH 产量相差不大,考虑到生产成本,选择 75 mL/250 mL 为最优装液量。

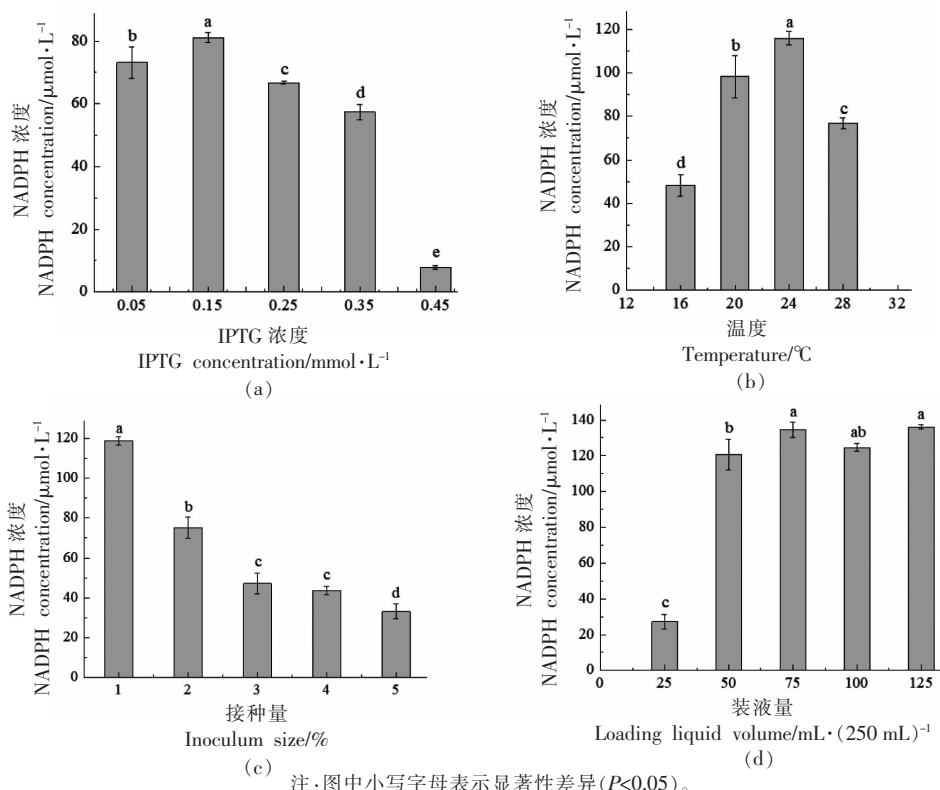


图 7 表达条件对重组菌株产辅酶 NADPH 的影响

Fig.7 Effect of the expression condition on the production of coenzyme NADPH by recombinant strains

## 2.9 正交试验优化结果

分别选取了诱导温度、IPTG 浓度、接种量和装液量 4 个因素的最佳取值范围,进行了 9 个试

验点的正交优化试验,对正交表  $L_9(3^4)$  试验结果采用直观(极差)分析方法进行分析,结果如表 3 所示。

表 3 正交试验设计优化的结果

Table 3 Results of orthogonal experimental optimization

试验号	诱导温度(A)/ $^{\circ}\text{C}$	IPTG 浓度(B)/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	接种量(C)/%	装液量(D)/ $\text{mL} \cdot (250 \text{ mL})^{-1}$	NADPH 产量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	3	3	3	1	34.74
2	3	1	2	3	49.53
3	2	3	1	3	76.10
4	1	1	1	1	82.67
5	1	3	2	2	107.66
6	1	2	3	3	117.73

(续表 3)

试验号	诱导温度(A)/°C	IPTG 浓度(B)/ mmol·L <sup>-1</sup>	接种量(C)/%	装液量(D)/mL ·(250 mL) <sup>-1</sup>	NADPH 产量/ μmol·L <sup>-1</sup>
7	2	1	3	2	69.09
8	3	2	1	2	34.54
9	2	2	2	1	63.68
K <sub>1</sub>	308.05	201.29	193.30	181.09	
K <sub>2</sub>	208.87	215.94	220.87	211.29	
K <sub>3</sub>	118.81	218.50	221.57	243.36	
k <sub>1</sub>	102.68	67.10	64.43	60.36	
k <sub>2</sub>	69.62	71.98	73.62	70.43	
k <sub>3</sub>	39.60	72.83	73.86	81.12	
极差 r	63.0793	5.7374	9.4214	20.7574	

因素极差越大,对指标影响就越显著。由表 3 可以看出,诱导温度因素极差 *r* 最大,表明诱导温度作为主要因素,对辅酶 NADPH 产量的影响最显著,因此在重组菌株合成辅酶 NADPH 的过程中应该合理控制诱导温度,应进行低温诱导。

由表 4 方差分析同样可以看出,4 个因素对辅酶产量的影响程度大小为:诱导温度>装液量>接种量>IPTG 浓度;以 4 个因素水平作为横坐标,以 NADPH 产量作为纵坐标,绘制因素与指标趋势图,如图 8 所示。

表 4 主体间效应的检验

Table 4 Tests of between-subjects effects

变异来源	III 型平方和	df	均方	F 值	显著性
校正模型	20 407.85 <sup>a</sup>	8	2 550.98	2 755.06	0.00
截距	135 002.42	1	135 002.42	145 802.61	0.00
诱导温度	17 795.51	2	8 897.75	9 609.57	0.00
IPTG 浓度	178.19	2	89.09	96.22	0.00
接种量	495.20	2	247.60	267.41	0.00
装液量	1 938.96	2	969.48	1 047.04	0.00
误差	16.67	18	0.93		
总计	155 426.94	27			
校正的总计	20 424.52	26			

从图 8 可以直观地看出,试验的最优组合为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即诱导温度 20 °C、IPTG 浓度 0.25 mmol/L、接种量 1.5%、装液量 100 mL,对此组合进行 3 次平行验证试验,在此条件下,辅酶 NADPH 的产量为 139.57 μmol/L。

### 2.10 诱导时间对辅酶 NADPH 再生的影响

诱导时间对辅酶 NADPH 再生的影响如图 9 所示。在诱导时间 0~48 h 范围内,辅酶 NADPH 的产量随着诱导时间的增加而显著增加,最高产量为 151.79 μmol/L,而在诱导时间超过 48 h 以后,辅酶 NADPH 的含量随着诱导时间的延长呈现出下降趋势,可能因为诱导时间越长,副产物代谢积累越多,加快营养物质的消耗,不利辅酶 NADPH

的合成。

## 3 结论

本研究克隆了 NADPH 再生的 2 个关键酶基因即葡萄糖激酶基因(*glk*)与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因(*zwf*),并将其导入到大肠杆菌 BL21(DE3)中,成功构建了重组工程菌大肠杆菌 BL21/pET-Duet-1-*glk-zwf*,葡萄糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶均得到了可溶性表达,实现了辅酶 NADPH 的高效再生。同时研究了 IPTG 浓度、诱导温度、接种量、装液量对辅酶 NADPH 再生的影响,其中诱导温度因素影响最为显著,通过正交设计优化试验,获得了重组工程菌株产辅酶 NADPH 的最佳工艺



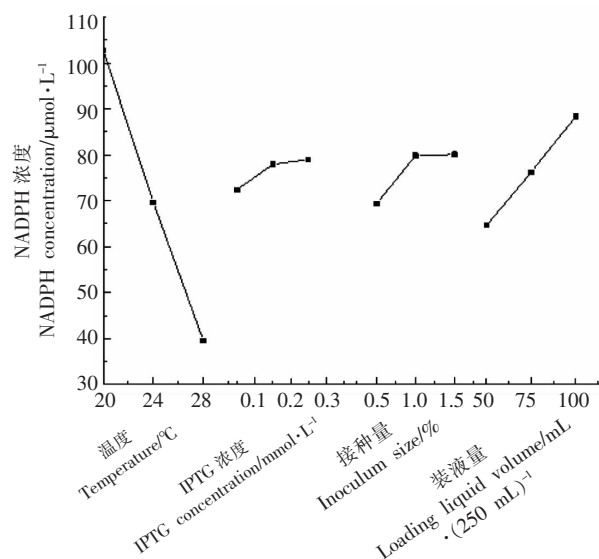


图8 4因素与指标趋势图

Fig.8 Graph of four factors and indicator trends

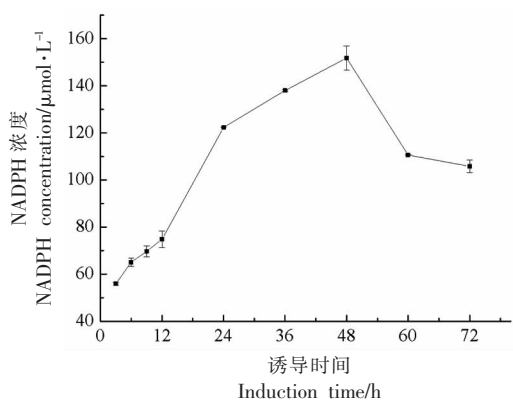


图9 1 L摇瓶中重组大肠杆菌产辅酶NADPH的时间过程

Fig.9 Time course of the production of coenzyme NADPH by recombinant *E. coli* in a 1 L shake flask

条件：诱导温度 20 °C、IPTG 浓度 0.25 mmol/L、接种量 1.5%、装液量 100 mL/250 mL。在此条件下进行 3 次平行验证试验，辅酶 NADPH 平均产量为 139.57  $\mu\text{mol/L}$ 。随后研究重组菌株在最佳工艺条件下进行 1 L 发酵摇瓶发酵产辅酶 NADPH 的时间过程，经 IPTG 诱导培养 48 h 后，辅酶 NADPH 产量高达 151.79  $\mu\text{mol/L}$ 。研究结果为辅酶 NADPH 循环再生工业化生产和应用提供了良好的理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] YAMOR W, SHIKANAI T. Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem in sustaining photosynthesis and plant growth[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67(1): 81-106.
- [2] 吕陈秋, 姜忠义, 王姣. 烟酰胺型辅酶 NAD(P)<sup>+</sup>和 NAD(P)H 再生的研究进展[J]. 有机化学, 2004, 29(11): 1366-1379.  
LÜ C Q, JIANG Z Y, WANG J. Progress in regeneration of NAD(P)<sup>+</sup> and NAD(P)H[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2004, 29(11): 1366-1379.
- [3] 王秋雨, 钦传光, 左小佳, 等. 伴有辅酶再生的生物催化过程[J]. 化学通报, 2009, 72(7): 587-593.  
WANG Q Y, QIN C G, ZUO X J, et al. Biocatalyst system with the regeneration of coenzyme [J]. Chemistry Bulletin, 2009, 72(7): 587-593.
- [4] 江金鹏, 吴旭日, 陈依军. 解决氧化还原酶反应体系中辅酶问题的策略及其应用[J]. 生物工程学报, 2012, 28(4): 410-419.  
WANG J P, WU X R, CHEN Y J. Strategy to solve cofactor issues in oxidoreductase catalyzed biocatalytic applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(4): 410-419.
- [5] YANG W, XU J H, PAN J, et al. Efficient reduction of aromatic ketones with NADPH regeneration by using crude enzyme from *Rhodotorula* cells and mannitol as cosubstrate[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 42(1): 1-5.
- [6] 陈宏文, 刘薇, 杜钰, 等. 工业微生物还原型辅酶 II 的代谢调控研究进展[J]. 化工进展, 2012, 31(11): 2535-2541.  
CHEN H W, LIU W, DU Y, et al. Progress of operation of NADPH metabolism in industrial strains [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2012, 31(11): 2535-2541.
- [7] 邓新星. 集胞藻 PCC6803 PpetE-petH 的构建及其强化辅酶 NADPH 再生的研究[J]. 微生物学报, 2016, 14(3): 51-59.  
DENG X X. Construction of *Synechocystis* PCC6803 PpetE-petH and strengthening coenzyme NADPH regeneration[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 14(3): 51-59.

- [8] 吴立新. 短小芽孢杆菌胞内 NADPH 的再生及羟基脂肪酸发酵优化的研究[J]. 生物工程学报, 2011, 11(6): 21-29.  
WU L X. Intracellular NADPH regeneration of *Bacillus pumilus* and fermentation optimization of hydroxy fatty acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 11(6): 21-29.
- [9] LEE W H, KIM M D, JIN Y S, et al. Engineering of NADPH regenerators in *Escherichia coli* for enhanced biotransformation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(7): 2761-2772.
- [10] SPAANS S K, WEUSTHUIS R A, VAN D O J, et al. NADPH-generating systems in bacteria and archaea[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(1): 1-27.
- [11] 郑雅楠, 陈少云, 刘文洪, 等. 基于己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶共表达的辅酶 NADPH 高效再生[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2619-2626.  
ZHENG Y N, CHEN S Y, LIU W H, et al. Efficient NADPH regeneration based on co-expression of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase[J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2619-2626.
- [12] PHAM S Q, GAO P, LI Z. Engineering of recombinant *E. coli* cells coexpressing P450<sub>pyr</sub>TM monooxygenase and glucose dehydrogenase for highly regio and stereoselective hydroxylation of alicycles with cofactor recycling[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(2): 363-373.
- [13] FURUYA T, KANNO T, YAMAMOTO H, et al. Biocatalytic production of 5-hydroxy-2-adamantanone by P450cam coupled with NADH regeneration[J]. Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic, 2013, 94(1): 111-118.
- [14] POULSEN B R, NHR J, DOUTHWAITE S, et al. Increased NADPH concentration obtained by metabolic engineering of the pentose phosphate pathway in *Aspergillus niger*[J]. FEBS Journal, 2005, 272(6): 1313-1325.
- [15] LIM S J, JUNG Y M, SHIN H D, et al. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon[J]. Journal of Bioence and Bioengineering, 2002, 93(6): 543-549.

## Efficient Regeneration of NADPH Based on Glucose Kinase and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase

Yu Ping, Yang Liuzhen, Ma Jian, Zhang Qili, Chen Qingwei

(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

**Abstract** Objective: To construct the recombinant strain of efficient NADPH regeneration and investigate its optimal process condition. Methods: The key enzyme genes *glk* and *zwf* were introduced into *Escherichia coli* by genetic engineering to achieve efficient NADPH regeneration. The NADPH regeneration condition was explored. Results: The recombinant *E. coli* BL21/pETDuet-1-*glk-zwf* harboring the key enzyme genes *glk* and *zwf* for efficient NADPH regeneration was successfully constructed. The optimal process condition for the production of NADPH by recombinant strain was obtained via orthogonal experiment, and was as follows: induction temperature 20 °C, IPTG concentration 0.25 mmol/L, inoculum size 1.5% and loading liquid volume 100 mL/250 mL. The production of NADPH reached 151.79 μmol/L after induction for 48 h in a 1 L shake flask under the optimal condition. Conclusion: This study provides a theoretical basis for efficient NADPH regeneration.

**Keywords** glucose kinase; glucose-6-phosphate dehydrogenase; efficient regeneration of coenzyme NADPH; orthogonal experimental optimization