



## 热稳定酯酰辅酶A合成酶的异源表达及酶学特性

董爽爽<sup>1,2</sup>, 王衍杰<sup>1</sup>, 季俊杰<sup>1</sup>, 郑舰艇<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院过程工程研究所, 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

<sup>2</sup> 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 【目的】为寻找能合成丙酰辅酶A和丁酰辅酶A等聚酮合成前体的生物催化剂, 用体外酶学实验对一个酯酰辅酶A合成酶进行了表征。【方法】利用丙二酰辅酶A合成酶作为输入序列, 通过BLAST程序在*Caldicellulosiruptor owensensis* OL的基因组中找到1个酯酰辅酶A合成酶基因。在大肠杆菌中进行了异源表达, 并通过亲和层析进行纯化。底物谱、最适反应条件、稳定性和动力学参数通过体外酶学实验进行表征, 而定点突变则用于活性中心的氨基酸残基的分析。【结果】该酶具有较好的底物宽泛性, 可识别丙酸、丁酸、2-甲基丙酸、戊酸、3-甲基丁酸、2-甲基丁酸以及环己甲酸等一系列单酸。反应最适温度为30 °C, 最适pH为7.0。70 °C保温8 h后仍有45%的活性残留, 表明该酶相对比较稳定。通过活性中心3个位点的定点突变可以改变酶的底物特异性。【结论】*C. owensensis* OL来源的酯酰辅酶A合成酶是潜在的生物催化剂, 可以用于聚酮前体的合成。

**关键词:** 热稳定性, 酯酰辅酶A合成酶, 底物特异性, 酶学性质, 定点突变

聚酮是由细菌、真菌及植物等产生的一大类结构复杂多样的天然产物, 在现代医疗中发挥重要作用, 如抗感染、抗肿瘤以及免疫抑制等<sup>[1-3]</sup>。聚酮的生物合成与脂肪酸类似, 由辅酶A (coenzyme A, CoA)活化的短链酸通过连续的脱羧聚合形成聚酮核心骨架, 再经一系列复杂的后修饰而形成, 如糖基化、甲基化和氧化等。与脂肪酸合成主要利用丙二酰CoA相比, 聚酮的生物合成可以利用更多种类的羧酸前体, 这是聚酮结构多样性

的重要原因<sup>[4]</sup>。

聚酮合成前体包括延伸单元和起始单元。前者主要包括丙二酰CoA和甲基丙二酰CoA; 后者更为多样化, 包括乙酰CoA、丙酰CoA、2-甲基丙酰CoA、2-甲基丁酰CoA和环己甲酰CoA等<sup>[5-6]</sup>。体外酶学重组是研究聚酮生物合成机制以及制备特定聚酮产物的有效手段, 然而上述合成前体价格非常昂贵, 很多根本没有商业化的产品, 限制了这种方法的广泛应用。为了解决聚酮合成前体

基金项目: 国家“973计划”(2013CB734000); 国家自然科学基金(31370101, 31570056), 北京市自然科学基金(5144031), 青年千人计划和中国科学院启动资金

\*通信作者。Tel: +86-10-82545065; E-mail: jtzheng@ipe.ac.cn

收稿日期: 2015-12-11; 修回日期: 2016-02-25; 网络出版日期: 2016-05-04

的来源问题, 人们将目光转向了酯酰CoA合成酶(acyl-CoA synthetase, ACS), 在ATP存在的情况下, 该酶催化羧酸与CoA缩合形成相应的酯酰CoA(图1)。目前应用较多的是来源于*Rhizobium trifolii*和*Streptomyces coelicolor*的丙二酰CoA合成酶(malonyl-CoA synthetase)(RtMatB, ScMatB)<sup>[7-9]</sup>。该酶具有较好的底物宽泛性, 可以合成丙二酰CoA以及 $\alpha$ 位有甲基、乙基、甲氧基和羟基等取代的延伸单元, 活性中心的蛋白质工程改造可以进一步拓展该酶的底物范围, 从而合成更多的非天然延伸单元。并且该酶可以利用结构简单的N-乙酰半胱胺(N-acetylcysteamine,

SNAC)为底物, 替代价格昂贵的CoA, 生成的相应产物丙二酰-SNAC可以被聚酮合酶作为延伸单元合成聚酮产物。

然而识别单酸, 用于合成聚酮合成起始单元的ACS研究相对较少。本研究中, 我们克隆表达了1个嗜热厌氧菌*Caldicellulosiruptor owensensis* OL来源的ACS(CoACS, GI: 503176952), 并对该酶的底物特异性、最适反应条件等特性进行了表征, 结果显示该酶可利用丙酸、丁酸、2-甲基丙酸、戊酸、3-甲基丁酸、2-甲基丁酸以及环己甲酸等多种单酸为底物, 具有作为聚酮前体合成工具酶的潜力。

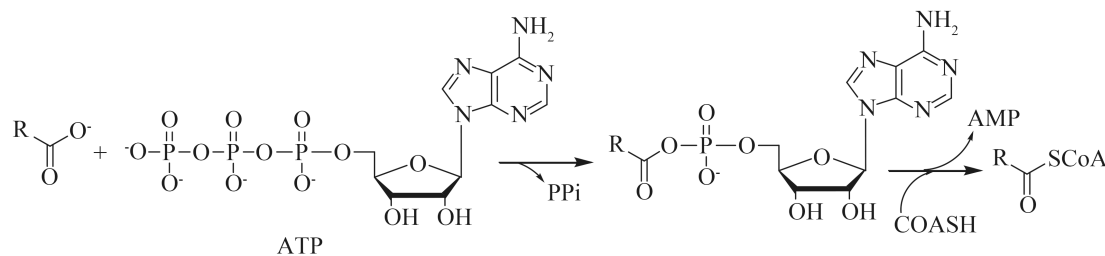


图 1. 酯酰CoA合成酶催化反应机制

Figure 1. Catalytic mechanism of acyl-CoA synthetase.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 基因组、菌株及质粒:** *C. owensensis* OL基因组由中国科学院过程工程研究所韩业君研究员赠予; *Escherichia coli* BL21 (DE3)、*E. coli* DH5 $\alpha$ 及pET-28a (+)载体为本实验室保藏。

**1.1.2 酶、引物、试剂及化合物:** 研究中所用DNA聚合酶为东洋纺(上海)生物科技有限公司产品; 核酸内切酶、T4 DNA连接酶购于北京NEB有限公司; 引物如表1所示, 由上海生工生物工程公司合成; 其它化学试剂除特别说明均购于国药集团化学试剂有限公司。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteamine, SNAC)、乙酰-SNAC、丙酰-SNAC、丁酰-SNAC、2-甲基丙酰-SNAC、2-甲基

丁酰-SNAC、3-甲基丁酰-SNAC、戊酰-SNAC的

表1. 研究中用到的引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
CoACSF	ATCGTAATCGCTAGCATGGCTTTTATTGAAA TGACTATTCCAACT
CoACSR	TGATTCGATGGATCCTCAAGCTGTTTCAATA TTTACTGCATCGTGA
F243HF	TGTACCGTTTTTCTACTGTCACGGACTTGTAT TAGGT
F243HR	ACAGTGAAAAAACGGTACAGGGATGCACAG CTTGTCTT
A314SF	ACTGGGATAATGGCAGGATCTCCTTGTCTTA TCAAGGTGA
A314SR	TCCTGCCATTATCCCAGTTCTCAGAGAAGAA AAGTCGAA
A336RF	AAGAGATTACAATACGTTATGGTCAAACAG AGGCATCACCT
A336RR	TATTGTAACTCTTTTCATGTGCATCTTTTCAA CAACC

合成及表征已在前期论文中发表<sup>[10]</sup>, 环己甲酰-SNAC的合成方法与上述酯酰-SNAC的合成方法相同, 核磁及质谱数据如下: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz): δ (ppm) 6.55 (s, 1H), 3.41 (q, *J*=6.3 Hz, 2H), 3.00 (t, *J*=6.6 Hz, 2H), 2.52-2.48 (m, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.90 (d, *J*=12.7 Hz, 2H), 1.78 (d, *J*=13.1 Hz, 2H), 1.66 (d, *J*=12.2 Hz, 1H), 1.48-1.42 (m, 2H), 1.31-1.24 (m, 3H); ESI-MS [M+Na]<sup>+</sup>, 226.1。

## 1.2 基因克隆、定点突变

以*C. owensensis* OL基因组为模板扩增目的基因, 内切酶*Nhe* I和*Bam*H I消化后, T4 DNA连接酶连接至pET-28a(+), 得重组质粒pET-28a-CoACS。定点突变以pET-28a-CoACS为模板, 表1中相应寡聚核苷酸为引物进行PCR扩增; 扩增产物经*Dpn* I内切酶消化处理后, 转化进*E. coli* DH5α感受态细胞。所有质粒及相应突变都经测序验证。

## 1.3 蛋白表达纯化

表达载体转化进*E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞, 挑取转化子于含50 μg/mL卡那霉素的LB中37 °C、220 r/min过夜培养。4 mL过夜培养物转接至1 L含相应抗生素的LB培养基中, 37 °C、220 r/min培养至 $OD_{600}$ 为0.6, 降温至16 °C加入0.2 mmol/L IPTG诱导蛋白表达。继续培养12 h后, 3000×g离心收集菌体, 结合缓冲溶液(50 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 10%甘油, pH 7.5)重悬, 超声破碎菌体, 13000×g离心除去细胞碎片。上清液倒入经结合缓冲液平衡过的镍亲和柱中, 加入冲洗缓冲液(结合缓冲液加15 mmol/L咪唑)以除去杂蛋白, 最后用洗脱缓冲液(结合缓冲液加300 mmol/L咪唑)将带有标签的蛋白洗出。SDS-PAGE检测, 确定分子量及纯度。

## 1.4 生化反应

重组酶的反应体系如下: 15 μmol/L CoACS, 4.2 mmol/L SNAC, 1.3 mmol/L ATP, 9 mmol/L

MgCl<sub>2</sub>, 15% (W/V)甘油和100 mmol/L HEPES (pH 7.5)。为检测酶的底物特异性, 向该体系中加入不同的羧酸, 终浓度为10 mmol/L, 30 °C反应过夜。为确定反应是否有新物质产生, 将上述体系中的酶换成相应缓冲液, 其余保持相同作为空白对照。

## 1.5 高效液相色谱分析

加入等体积甲醇终止反应, 10000×g离心4 min除去蛋白及其他沉淀, 取出20 μL上清进样检测, 通过与标准样品比较确定是否有预期产物生成。流动相A和B分别为水和甲醇; 程序为0-15 min流动相B比例由10%增加至100%, 维持B 100% 5 min, 流速0.8 mL/min。检测丙二酰-SNAC时, 流动相含0.1%的三氟乙酸。色谱柱为迪马C<sub>18</sub>反相柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为245 nm。

## 1.6 最适pH测定

将1.5 μmol/L重组酶加入含有100 mmol/L磷酸缓冲液(pH分别为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0), 4.2 mmol/L SNAC, 1.3 mmol/L ATP, 10 mmol/L戊酸, 9 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 15% (W/V)甘油的体系中, 30 °C反应10 min后终止反应, 按1.2.4中描述方法测定其中戊酰-SNAC含量。

## 1.7 最适温度测定

上述反应体系(pH 7.0)分别在20、30、40、50、60、70、80 °C下反应10 min后终止反应, 按1.2.4中描述方法测定其中戊酰-SNAC含量。

## 1.8 热稳定性测定

反应体系(1.5 μmol/L重组酶, 100 mmol/L磷酸缓冲液pH 7.0, 10 mmol/L戊酸, 9 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 15% (W/V)甘油)置于70 °C保温0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 h后, 加入4.2 mmol/L SNAC及1.3 mmol/L ATP, 30 °C反应10 min后终止反应, 按1.2.4中描述方法测定其中戊酰-SNAC含量。

## 1.9 动力学参数的测定

反应体系包括1.5  $\mu\text{mol/L}$ 酶, 100 mmol/L磷酸缓冲液pH 7.0, 9 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 15% (W/V)甘油。改变待测底物的浓度, 维持其他2种底物的浓度不变, 30  $^\circ\text{C}$ 反应10 min后, 用HPLC测定产物的量。测定戊酸动力学参数时, 保持ATP和SNAC的浓度分别为5 mmol/L和20 mmol/L, 戊酸浓度从0.1 mmol/L增加至10.0 mmol/L; 当测定ATP的动力学参数时, 保持戊酸和SNAC的浓度分别为10 mmol/L和20 mmol/L不变, ATP浓度从0.05 mmol/L增加至5.00 mmol/L; 而当测定SNAC的动力学参数时, 保持戊酸和ATP的浓度分别为10 mmol/L和5 mmol/L不变, SNAC浓度从0.5 mmol/L增加至20.0 mmol/L。将反应初速度拟合到米氏公式, 得出相应底物的动力学参数。

### 1.10 重组酶对不同底物羧酸的比活力测定

向含有100 mmol/L磷酸缓冲液pH 7.0, 9 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 15% (W/V)甘油, 20 mmol/L SNAC, 5 mmol/L ATP及10 mmol/L羧酸的50  $\mu\text{L}$ 体系中加入5 ng重组酶(当以2-甲基丁酸为底物时, 加入25 ng重组酶), 30  $^\circ\text{C}$ 反应10 min后终止反应, 用HPLC测定产物峰面积并将值代入相应酯酰-SNAC的标准曲线中确定产物生成量, 并进一步计算出重组酶对不同羧酸的比活力。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组酶的构建与纯化

用ScMatB氨基酸序列在*C. owensensis* OL基因组中进行BLAST搜索, 发现蛋白Calow\_0635与ScMatB有约30%的序列同源性。通过PCR从*C. owensensis* OL基因组中克隆出该基因片段并插入到pET-28a (+)。重组质粒转化进*E. coli* BL21 (DE3), 0.2 mmol/L IPTG、16  $^\circ\text{C}$ 下诱导表达过夜。镍柱亲和层析得到蛋白, SDS-PAGE分析显

示分子量约为60 kDa, 与CoACS的理论分子量62.2 kDa基本相符(图2)。

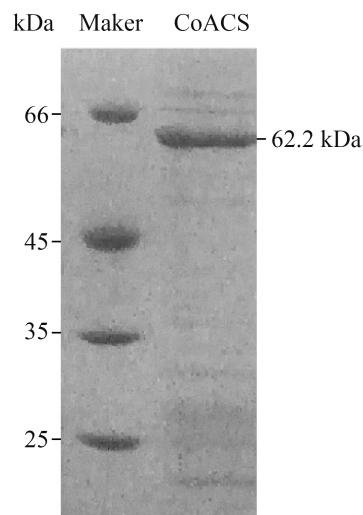


图 2. CoACS SDS-PAGE电泳分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of CoACS.

### 2.2 底物识别

ScMatB的晶体结构已经被解析, 该结构显示活性中心的精氨酸残基(R283)与丙二酰CoA中的自由羧基形成盐桥, 帮助反应过程中底物和产物的定向(图3)。与RtMatB和ScMatB相比, CoACS活性中心的精氨酸突变为丙氨酸。在聚酮合酶酰基转移酶结构中精氨酸到色氨酸、丝氨酸等侧链无电荷氨基酸的突变, 使得酰基转移酶识别底物由双羧酸转变为单羧酸, 因此推测CoACS识别的底物也是单羧酸。

为验证CoACS的底物特异性, 选取9种聚酮合成起始单元包括乙酸、丙酸、丁酸、2-甲基丙酸、戊酸、3-甲基丁酸、2-甲基丁酸、2,3-二甲基丙烯酸和环己甲酸作为底物(图4), 进行酶学反应, 以不加酶的反应作为对照。前人研究已发现SNAC可以在酯酰CoA合成反应中替代CoA, 为降低成本, 在后续所有反应中以SNAC作为底物。反应产物HPLC分析显示CoACS能够以丙酸、丁酸、2-甲基丙酸、戊酸、3-甲基丁酸、2-甲基丁酸及环己甲酸为底物生成相应的酯酰-SNAC。

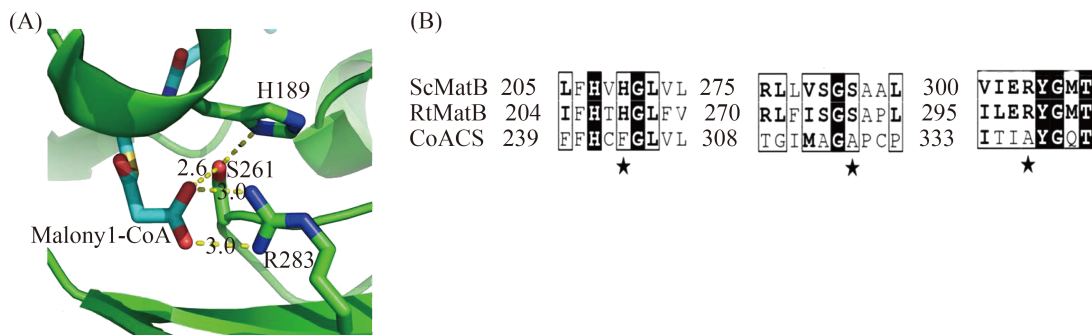


图 3. 酰基辅酶A合成酶与底物羧基作用位点分析

Figure 3. Active site residues interacting with carboxyl group. A: H189, S261 and R283 of ScMatB (PDB code: 3NYR) interact with carboxyl group of malonyl-CoA which was shown in cyan (distances in Å); B: sequence alignment of ScMatB (GI: 327200583), RtMatB (GI: 3982573) and CoACS (GI: 503176952). Three key residues interacting with carboxyl group were highlighted by black pentangles.

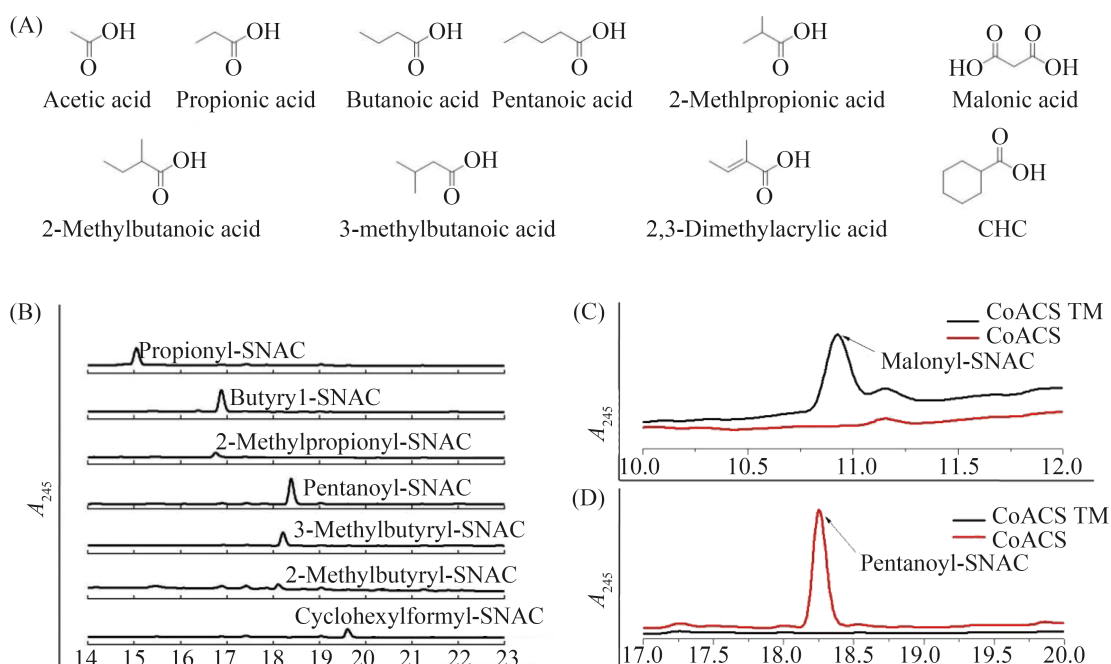


图 4. CoACS及CoACS TM的底物特异性分析

Figure 4. Substrates specificity of CoACS and CoACS TM. A: carboxylic acids utilized in this study; B: analysis of the products from reactions catalyzed by CoACS; C: reactions catalyzed by CoACS and CoACS TM with malonic acid as the substrate; D: reactions catalyzed by CoACS and CoACS TM with pentanoic acid as the substrate.

和预期一致, CoACS不能催化丙二酸与SNAC反应生成丙二酰-SNAC。为验证精氨酸在双羧酸识别中的作用, 将CoACS中的相应丙氨酸突变为精氨酸(A336R)。然而催化产物分析, 表明该单一位点的突变并不能使该酶识别丙二酸。进

一步的分析表明243位和314位的氨基酸也可能在底物识别中起重要作用。引入F243H和A314S后, 三突变蛋白(CoACS TM)可以催化丙二酰-SNAC的生成(ESI-MS  $[M+Na]^+$ , 228.0), 但丧失了催化生成戊酰-SNAC的能力。

### 2.3 最适反应条件及热稳定性

为对反应体系进行优化,以戊酸为底物测定CoACS的最适反应条件。如图5所示,CoACS在pH为7.0时活性最高,pH为5.0时酶的相对活性下降至20%;最适反应温度为30 °C,在20–60 °C范

围内时,该酶保持70%以上的活性,随着温度的进一步升高,相对活性的变化较为明显,80 °C时酶的相对活性降到30%左右。与预期一致,该酶具有较好的热稳定性,在70 °C下温育8 h后仍有约45%的活性残留。

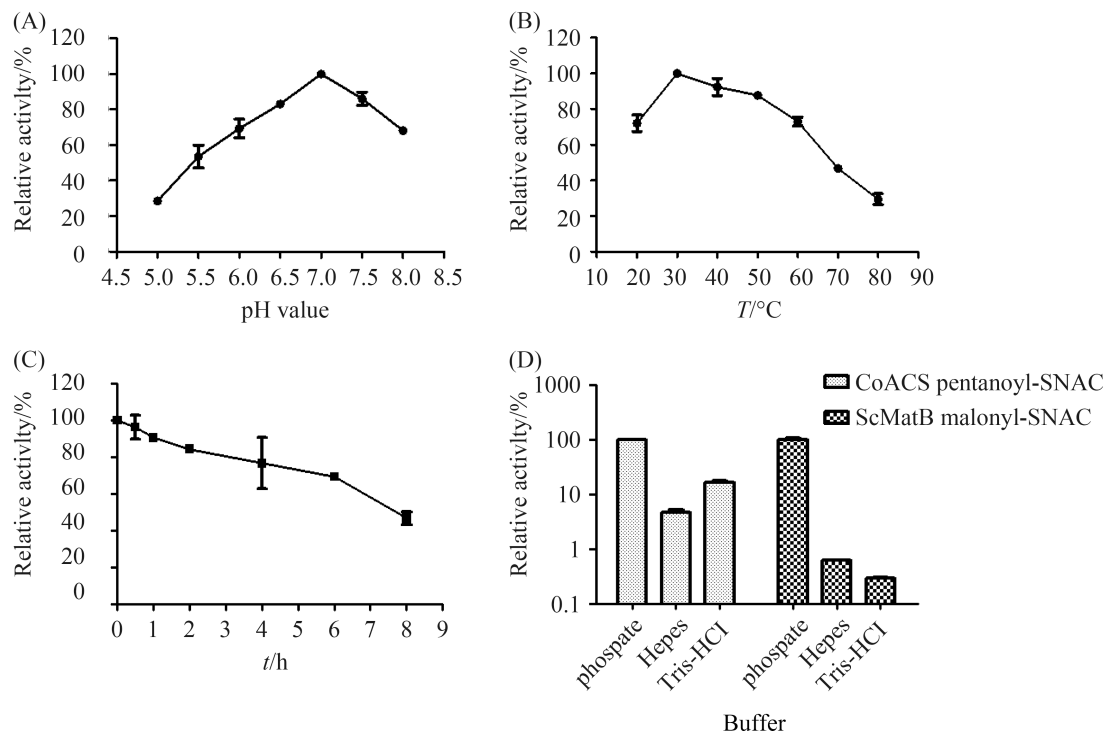


图 5. pH、温度及缓冲溶液对重组酶CoACS的活性影响

Figure 5. Effect of pH, temperature and buffer on the activity of CoACS. A: effect of pH on CoACS activity; B: effect of temperature on CoACS activity; C: thermal stability of CoACS at 70 °C; D: effect of buffer on CoACS activity.

### 2.4 动力学参数

为进一步对该酶进行表征,测定了以戊酸、SNAC及ATP作为底物时的酶动力学参数。利用戊酰-SNAC标准品,做出戊酰-SNAC量与峰面积关系的标准曲线。将实验测得的峰面积代入标准曲线计算出反应得到的产物的浓度。利用GraphPad Prime根据米氏方程得到相应的表观动力学参数(表2)。测定1种底物的动力学参数时,其它2种底物保持过量,以确保不会限制反应的进行。CoACS对于戊酸的 $k_{cat}/K_m$ 值为783.56 L/(mol·s),

远高于其它可以催化戊酸的肉桂酰CoA合成酶、苯甲酰CoA合成酶、苯乙酰CoA合成酶[ $k_{cat}/K_m$ 分别为2.5、7.0、110 L/(mol·s)]<sup>[11]</sup>。

表2. 动力学参数

Table 2. Kinetic parameters

Substrates	$K_m$ /(mmol/L)	$k_{cat}$ /(s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ / [L/(mol·s)]
Pentanoic acid	1.9±0.3	1.51±0.07	783.56
SNAC	4.1±0.6	1.40±0.06	337.85
ATP	1.0±0.1	14.58±0.73	14127.91

## 2.5 重组酶的比活力

为评价该酶对不同羧酸相对活性的差异,又表征了该酶对于不同羧酸的比活力。将活力单位定义为每分钟产生1  $\mu\text{mol}$ 产物所需要酶的量,在底物过量的情况下,测定产物酯酰-SNAC的生成量,进一步计算出重组酶对不同酸的比活力。从表3中可以看出,CoACS对于丁酸和戊酸的催化活性较高,但对于带有支链的2-甲基丙酸、3-甲基丁酸及2-甲基丁酸的活性较低。

表3. 重组酶对不同羧酸的比活力

Table 3. Specific activity of CoACS towards different acids

Substrates	Specific activity/(U/mg) <sup>a</sup>
Propionic acid	0.694±0.062
Butyric acid	6.071±0.720
2-Methyl-propionic acid	0.458±0.048
Pentanoic acid	6.250±0.040
3-methyl-butyrac acid	0.330±0.034
2-methyl-butyrac acid	0.056±0.012
Cyclohexanecarboxylic acid	0.752±0.171

<sup>a</sup>: One unit of activity is defined as the amount of CoACS required to produce 1  $\mu\text{mol}$  product per minute.

## 3 讨论

聚酮天然产物在医药、农业和畜牧业等领域有广泛的应用,生物合成过程表现出的不同层次的模块化特征使其成为合成生物学研究的热点。体外酶学重组是认识聚酮生物合成机制,从而进行理性设计的重要手段。然而一个明显的困难是聚酮合成的酯酰CoA (或SNAC)前体难以获得。MatB能够利用丙二酸、甲基丙二酸等合成多种延伸单元。在体外酶反应体系中,利用MatB提供前体,红霉素聚酮合酶第6模块可以一次性催化合成将近100 mg的聚酮产物。与MatB不同,本研究中克隆表达的CoACS以单羧酸为底物,可以催化丙

酸、丁酸、2-甲基丙酸、戊酸、3-甲基丁酸、2-甲基丁酸及环己甲酸这7种底物与CoA类似物SNAC反应,生成相应的酯酰-SNAC产物,这些产物可以作为聚酮合成的起始单元,如丙酰SNAC可用作红霉素合成起始单元<sup>[12]</sup>,2-甲基丙酰SNAC和2-甲基丁酰SNAC则可用作阿维菌素合成起始单元。因此CoACS的克隆和表达进一步扩充了可以酶法获得的聚酮合成前体库。

来自嗜热微生物的极端酶显示出良好的热稳定性和活力,一直被视为理想的工具酶,在工业生产中有广泛的应用。*C. owensensis* OL是一株嗜热厌氧菌,最适生长温度为75 °C。其基因组已经被测序,并且已有一些酶被从该菌株中克隆表达和利用,因此*C. owensensis* OL是热稳定酶的潜在来源<sup>[13-15]</sup>。虽然已有多个ACS被用于聚酮前体的合成,但都来源于最适生长温度为20-40 °C的中温微生物<sup>[16-17]</sup>。本研究从*C. owensensis* OL克隆的CoACS表现出较好的热稳定性,70 °C保温8 h后仍有约45%的活性残留,然而其最适反应温度却为30 °C,远低于菌株的最适生长温度。我们注意到丙酰-SNAC等产物,会自发水解,且随温度升高,水解速度逐渐加快。因此CoACS表现出的较低的最适反应温度可能是酶催化反应和产物自发水解共同起作用的结果。

CoACS具有较好的底物宽泛性,可催化直链的丙酸、丁酸和戊酸,还可以催化带支链的2-甲基丙酸、3-甲基丁酸、3-甲基丁酸以及环己甲酸,这一点与已报道的MatB不同。在本研究中,通过F243H、A314S和A336R 3个点突变,我们成功地把CoACS由识别单羧酸的酶转变成识别双羧酸的酶,引入更多突变到CoACS的活性中心,有可能进一步拓宽其底物范围,从而合成更多非天然酯酰CoA,为聚酮的体外合成提供更为多样性的前体。

## 参考文献

- [1] Hertweck C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(26): 4688–4716.
- [2] Koryakina I, McArthur J, Randall S, Draelos MM, Musiol EM, Muddiman DC, Weber T, Williams GJ. Poly specific *trans*-acyltransferase machinery revealed via engineered acyl-CoA synthetases. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(1): 200–208.
- [3] Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 380–416.
- [4] Smith S, Tsai SC. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports*, 2007, 24(5): 1041–1072.
- [5] Chan YA, Podevels AM, Kevany BM, Thomas MG. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Natural Product Reports*, 2009, 26(1): 90–114.
- [6] Moore BS, Hertweck C. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Natural Product Reports*, 2002, 19(1): 70–99.
- [7] An JH, Lee GY, Jung JW, Lee W, Kim YS. Identification of residues essential for a two-step reaction by malonyl-CoA synthetase from *Rhizobium trifolii*. *The Biochemical Journal*, 1999, 344 Pt 1: 159–166.
- [8] Hughes AJ, Keatinge-Clay A. Enzymatic extender unit generation for *in vitro* polyketide synthase reactions: structural and functional showcasing of *Streptomyces coelicolor* MatB. *Chemistry & Biology*, 2011, 18(2): 165–176.
- [9] Pohl NL, Hans M, Lee HY, Kim YS, Cane DE, Khosla C. Remarkably broad substrate tolerance of malonyl-CoA synthetase, an enzyme capable of intracellular synthesis of polyketide precursors. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(24): 5822–5823.
- [10] Wang F, Wang YJ, Ji JJ, Zhou Z, Yu JK, Zhu H, Su ZG, Zhang LX, Zheng JT. Structural and functional analysis of the loading acyltransferase from avermectin modular polyketide synthase. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(4): 1017–1025.
- [11] Go MK, Chow JY, Cheung VWN, Lim YP, Yew WS. Establishing a toolkit for precursor-directed polyketide biosynthesis: exploring substrate promiscuities of acid-CoA ligases. *Biochemistry*, 2012, 51(22): 4568–4579.
- [12] Rajashekhara E, Watanabe K. Propionyl-coenzyme A synthetases of *Ralstonia solanacearum* and *Salmonella choleraesuis* display atypical kinetics. *FEBS Letters*, 2004, 556(1/3): 143–147.
- [13] Blumer-Schuette SE, Ozdemir I, Mistry D, Lucas S, Lapidus A, Cheng JF, Goodwin LA, Pitluck S, Land ML, Hauser LJ, Woyke T, Mikhailova N, Pati A, Kyrpides NC, Ivanova N, Detter JC, Walston-Davenport K, Han SS, Adams MW, Kelly RM. Complete genome sequences for the anaerobic, extremely thermophilic plant biomass-degrading bacteria *Caldicellulosiruptor hydrothermalis*, *Caldicellulosiruptor kristjanssonii*, *Caldicellulosiruptor kronotskyensis*, *Caldicellulosiruptor owensensis*, and *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(6): 1483–1484.
- [14] Huang CY, Patel BK, Mah RA, Baresi L. *Caldicellulosiruptor owensensis* sp. nov., an anaerobic, extremely thermophilic, xyloanalytic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48(1): 91–97.
- [15] Mi SF, Jia XJ, Wang JZ, Qiao WB, Peng XW, Han YJ. Biochemical characterization of two thermostable xyloanalytic enzymes encoded by a gene cluster of *Caldicellulosiruptor owensensis*. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105264.
- [16] Gulick AM, Starai VJ, Horswill AR, Homick KM, Escalante-Semerena JC. The 1.75 Å crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphate and coenzyme A. *Biochemistry*, 2003, 42(10): 2866–2873.
- [17] Shimizu S, Inoue K, Tani Y, Yamada H. Butyryl-CoA synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*-purification and characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1981, 103(4): 1231–1237.



# Heterologous expression and characterization of a thermostable acyl-CoA synthetase

Shuangshuang Dong<sup>1,2</sup>, Yanjie Wang<sup>1</sup>, Junjie Ji<sup>1</sup>, Jianting Zheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] An acyl-CoA synthetase (ACS) was characterized by *in vitro* biochemical assays to get a potential biocatalyst for the generation of polyketide precursors such as propionyl-CoA and butyryl-CoA. [Methods] An ACS was identified in *Caldicellulosiruptor owensensis* OL genome by BLAST program using malonyl-CoA synthetase as the query sequence. The enzyme was heterologously expressed in *Escherichia coli* cells and purified to homogeneity by affinity purification. *In vitro* biochemical assays were used to reveal the substrate profile, the optimum reaction condition, the stability and the kinetics of the enzyme while the site-directed mutagenesis was used to assay the function of active site residues. [Results] The enzyme was promiscuous enough to accept propionic acid, butyric acid, 2-methyl-propionic acid, pentanoic acid, 2-methyl-butyric acid, 3-methyl-butyric acid and cyclohexanecarboxylic acid as the substrates. It was most active at 30 °C and pH 7.0 and relatively stable because 45% activity remained after 8 hours incubation at 70 °C. Interestingly, the substrate specificity of the enzyme could be switched by engineering three residues of active site. [Conclusion] The ACS from *C. owensensis* OL was a potential biocatalyst for the generation of polyketide precursors.

**Keywords:** thermostability, acyl-CoA synthetase, substrate specificity, biochemical characterization, site-directed mutagenesis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Program on Key Basic Research Project (2013CB734000), by the National Natural Science Foundation of China (31370101, 31570056), by the Beijing Natural Science Foundation (5144031), by the Recruitment Program of Global Experts of China, and by the Starting Fund of the Chinese Academy of Sciences

\*Corresponding author. Tel: +86-10-82545065; E-mail: jtzheng@ipe.ac.cn

Received: 11 December 2015; Revised: 25 February 2016; Published online: 4 May 2016