

重组葡萄糖脱氢酶的酶学性质及其偶联辅酶再生

余涛¹, 胡蝶², 邬敏辰^{*3}, 汪俊卿², 冯峰¹, 顾颖³

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为解决生物催化氧化还原反应中辅酶循环问题, 人工合成密码子优化后的嗜酸热源体 *Thermoplasma acidophilum* 葡萄糖脱氢酶基因 *Sygdh*, 于 *E. coli* BL21(DE3) 中表达, 粗酶液经镍柱亲和和层析获得纯化的重组葡萄糖脱氢酶 SyGDH。SDS-PAGE 显示相对分子质量为 41.0 kDa。酶学性质分析表明: 该酶的最适 pH 值为 7.5, 在 pH 6.0~8.0 稳定; 最适反应温度为 40 °C, 在 55 °C 以下稳定; 最适条件下其比活性达 4.5 U/mg; Zn²⁺ 对其有明显激活作用; 该酶对 NADP⁺ 的亲合力大于 NAD⁺ 且对大多数有机溶剂有良好的耐受性; 对 D-葡萄糖的 K_m 和 V_{max} 值分别为 28.2 mmol/L 和 6.5 U/mg。在葡萄糖脱氢酶与羧基还原酶偶联构建的 NADPH 辅酶循环体系中, 以 4-氯乙酰乙酸乙酯为底物, 羧基还原酶催化产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯的产率为 99.0%, 是未添加葡萄糖脱氢酶时产物产率的 3.11 倍, 表明重组 SyGDH 具有为生物催化氧化还原反应提供辅酶 NADPH 再生的能力。

关键词: 葡萄糖脱氢酶; 酶学性质; 羧基还原酶; 辅酶循环; 生物催化

中图分类号: TQ 925 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)09—0910—07

Enzymatic Characterization and Coenzyme Regeneration of a Recombinant Glucose 1-Dehydrogenase

YU Tao¹, HU Die², WU Minchen^{*3}, WANG Junqing², FENG Feng¹, GU Ying³

(1. School of Pharmaceutics Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A codon-optimized gene (named *Sygdh*) encoding a glucose 1-dehydrogenase of *Thermoplasma acidophilum* was cloned into the plasmid pET28a and functionally expressed in *Escherichia coli*. The expressed enzyme was purified to homogeneity using Ni-NTA affinity chromatography with an apparent molecular weight of 41.0 kDa by SDS-PAGE analysis and characterized using the model substrate of D-glucose. The purified recombinant SyGDH was 4.5 U/mg at pH 7.5 and 45 °C, and highly stable at pH 6.0~8.0 and 55 °C or below. It was activated by Zn²⁺, but strongly inhibited by Cu²⁺ and not significantly affected by other metal ions tested and EDTA. The K_m and V_{max} of recombinant SyGDH towards D-glucose were 28.2 mmol/L and 6.5 U/

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271811)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail: biowmc@126.com

mg, respectively. The results showed that SyGDH exhibits much higher affinity with NADP^+ than NAD^+ and remarkably resists to several organic solvents. Furthermore, two recombinant strains *E. coli* BL21/pET28a-SI and *E. coli* BL21/pET28a-Sygdh, which include recombinant NADPH-dependent carbonyl reductase and recombinant SyGDH, respectively, were mixed and used for the asymmetric reduction of Ethyl 4-chloroacetate to Ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate in the coenzyme cycle system. The product yield reached 99.0%, which is 3.11 fold as high as that of reaction without adding recombinant SyGDH strain, confirming that the recombinant SyGDH could be used as NADPH regenerator in biocatalysis oxidation and reduction system.

Keywords: Glucose 1-dehydrogenase, enzymatic characterization, carbonyl reductase, coenzyme cycle, biocatalysis

葡萄糖脱氢酶 (EC 1.1.1.47, glucose 1-dehydrogenase, GDH) 能够特异性地催化 D-葡萄糖生成葡萄糖酸, 并伴随 NAD(P)^+ 向辅酶 NAD(P)H 的转化。与辅酶循环系统中甲酸脱氢酶和乳酸脱氢酶相比, 葡萄糖脱氢酶利用廉价的葡萄糖, 并可适用于 NADH 和 NADPH 的再生, 因此在辅酶循环系统中, 葡萄糖脱氢酶常为生物催化氧化还原反应提供还原力氢^[1-3]。在生物催化氧化还原反应中, 底物大都难溶于水, 为提高底物的溶解度, 常需使用有机溶剂作为助溶剂, 但有机溶剂能破坏蛋白质表面的水化层使蛋白质结构发生变化, 从而导致酶蛋白失活^[4], 这种催化体系的限制使得耐有机溶剂的生物酶的市场需求更加迫切。目前, 虽已有关耐有机溶剂葡萄糖脱氢酶的报道, 但数量较少, 如来源于芽胞杆菌 (*Bacillus* sp)^[5]、球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*)^[6]、嗜酸热源体 (*Thermoplasma acidophilum*)^[7] 的葡萄糖脱氢酶等。耐有机溶剂的葡萄糖脱氢酶也越来越受到广大生物催化研究者的青睐^[8-11]。

1989年, Smith^[7]等从嗜酸热源体 (*T. acidophilum*) 中获得的野生型葡萄糖脱氢酶 (GDH) 既能耐受有机溶剂, 还具有耐高温的特点, 在 75 °C 时的半衰期为 3 h。2000年, 随着嗜酸热源体基因组的破解, 该葡萄糖脱氢酶 (GDH) 的基因可较容易地从 GenBank 数据库中获得^[12]。基于嗜酸热源体葡萄糖脱氢酶优良的酶学性质, 作者将其基因 *gdh* (GenBank 登录号: CAC12026.1) 进行了密码子优化后人工合成基因, 命名为 *Sygdh*, 并将该基因在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中高效表达。同时, 作者还研究了重组葡萄糖脱氢酶 (SyGDH) 温

度、pH、辅酶依赖性及其有机溶剂耐受性等酶学性质, 并利用葡萄糖脱氢酶重组菌和作者所在研究室构建的 NADPH 依赖型羰基还原酶重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-SI 构建偶联辅酶再生体系, 研究其偶联辅酶再生性质。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

大肠杆菌 *E. coli* JM109 和 *E. coli* BL21 (DE3), 购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 *E. coli* BL21/pET28a-SI, 由作者所在实验室保藏; 克隆质粒 pUCm-T, 购自上海 Sangon 公司; 表达质粒 pET28a, 购自 Invitrogen 公司。

LB 培养基 (质量分数): 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl (固体培养基添加质量分数 2% 琼脂)。

1.2 主要试剂和仪器

rTaq 酶、T4 连接酶、限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III、250 bp DNA Ladder Marker、 λ -*Hind* III digest DNA Ladder Marker 和低相对分子质量蛋白质 Marker, 购于大连 TaKaRa 公司; 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 和 EZ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 购自上海 Sangon 公司; NAD^+ 、 NADPH 、 NADP^+ , 购于上海源叶生物科技有限公司; 4-氯乙酰乙酸乙酯、(R)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯、(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯, 购于北京百灵威科技有限公司; 一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装, 购于北京天恩泽有限公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

Thermo MK3 型酶标仪, 购于美国 Thermo 公司; GC-20104 AFSC, 购自 SHIMADZU 公司; 手性气

相色谱柱 Chirasil-Dex-CB(CP7502, 25 m×0.25 mm×0.25 μm), 购自美国 Agilent 科技公司。

1.3 *Sygdh* 基因的密码子优化及合成

由于宿主细胞的不同, 其对编码氨基酸的密码子也存有不同偏爱性^[13]。通过对来源于嗜酸热源体的 GDH 成熟肽基因序列进行分析, 发现其密码子偏爱性与大肠杆菌的密码子偏爱性有一定差异。为实现该 GDH 基因 *gdh* 在大肠杆菌中的高效表达, 参照大肠杆菌偏爱性密码子表对 *gdh* 中的稀有密码子进行优化, 并在该基因 N 端引入 6 个编码组氨酸的标签序列, 在两端分别添加 *Nco* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点。优化后基因命名为 *Sygdh*, 由上海 Sangon 公司合成并与 pUCm-T 连接, 获得重组质粒 pUCm-T-*Sygdh*。

1.4 重组表达质粒 pET28a-*Sygdh* 的构建

将 pUCm-T-*Sygdh* 进行 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切, 胶回收目的基因 *Sygdh*, 在 T4 连接酶的作用下, 与经相同双酶切的表达质粒 pET28a 在 16 °C 下连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经卡那霉素抗性筛选, 获得阳性重组菌, 并送至上海 Sangon 公司测序, 测序正确后命名该重组表达质粒为 pET28a-*Sygdh*。

1.5 重组 SyGDH 的诱导表达及纯化

挑取阳性单菌落接种于 2 mL 含有 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基, 于 37 °C、220 r/min 振荡培养 12 h。取 300 μL 培养液转接于 30 mL 含有 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中于 37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 向培养物中添加终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 于 25 °C、220 r/min 振荡培养 12 h 后, 在 4 °C 下, 8 000 r/min 离心收集菌体。菌体经 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤两次, 称取湿菌体 2 g, 加入 15 mL 上述缓冲液悬浮细胞, 冰浴并超声破碎 (工作 3 s, 间隔 8 s, 工作时间 30 min), 15 000 r/min 离心 15 min, 收集上清得粗酶液。粗酶液参照 Ding^[6] 等方法进行纯化, 得到重组葡萄糖脱氢酶 (SyGDH), 用于 SDS-PAGE 分析。蛋白质含量测定采用 Bradford 法, 以牛血清白蛋白质 BSA 为标准品。

1.6 重组 SyGDH 活力的测定

葡萄糖脱氢酶活力测定参照张等^[5] 的紫外分光光度计法, 并略作修改。总反应体系为 200 μL, 分别加入终浓度为 100 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0)

缓冲液、2.0 mmol/L 的 NADP⁺、100 mmol/L 的 D-葡萄糖, 37 °C 保温 2 min, 加入适量纯酶液, 立即检测 1 min 内 340 nm 处吸光值的变化。酶活力定义为: 在上述条件下, 每分钟催化生成 1 μmol 的 NADPH 所需的酶量定义为一个酶活单位 (U)。

1.7 产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯的测定

产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯检测参照 Park^[14] 等的气相色谱法并略作修改: 采用 GC-2014 型气相色谱仪、Chirasil-Dex-CB 手性色谱柱和氢火焰离子检测器 (FID); 检测程序: 进样口温度和检测器温度均为 250 °C, 初始柱温在 80 °C 维持 3 min, 以 4 °C/min 升温梯度升温至 180 °C 维持 2 min; 载气为氢气, 载气体积流量为 2.0 mL/min, 分流比 1:50。底物 4-氯乙酰乙酸乙酯和产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯的出峰时间分别为 11.39 min 和 14.64 min。

$$\text{产物产率} = \frac{(\text{产物 (4-氯-3-羟基丁酸乙酯) 的量 (mol)})}{(\text{底物 (4-氯乙酰乙酸乙酯) 的量 (mol)})} \times 100\% \quad (1)$$

1.8 重组 SyGDH 酶学性质测定

1.8.1 最适反应 pH 及其稳定性 在 37 °C 条件下, 按照 1.6 酶活力测定方法测定重组 SyGDH 在不同 pH 值下 (100 mmol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液 (pH 3.0~8.0), 100 mmol/L Gly-NaOH 缓冲液 (pH 8.5~10.5), pH 值间隔为 0.5) 的相对酶活性, 以最高相对酶活性所对应的 pH 值定为重组 SyGDH 的最适反应 pH。将纯化后重组 SyGDH 分别置于不同 pH 的缓冲液 (同上) 中, 于 40 °C 保温 1 h 后, 按照 1.6 的方法测定残余酶活性, 计未处理酶的酶活性为 100%, 当残余酶活力达到 80% 以上, 即定义为稳定, 从而确定重组 SyGDH 的 pH 稳定性。

1.8.2 最适反应温度及其稳定性 在最适反应 pH 下, 按照 1.6 的方法测定在不同温度下 (30~80 °C, 温度间隔为 10 °C) 的相对酶活性, 以最高相对酶活性所对应的温度定为重组 SyGDH 的最适反应温度。将纯化后重组 SyGDH 分别置于不同温度 (30~80 °C, 温度间隔为 5 °C) 下保温 1 h 后, 按照 1.6 的方法测定残余酶活性, 计未处理酶的酶活性为 100%, 当残余酶活力达到 80% 以上, 即定义为稳定, 从而确定重组 SyGDH 的温度稳定性。

1.8.3 金属离子和 EDTA 对重组 SyGDH 酶活性的影响 将纯化后重组 SyGDH 与不同金属离子或 EDTA 溶液 (终浓度为 2.0 mmol/L) 混合, 于 40 °C 保

温 1 h,按 1.6 的方法测定残余酶活性。计同样条件下只加缓冲液处理的酶的活性为 100%,当残余酶活力为 80%以下,即定义为有抑制作用,以此来衡量所测金属离子和 EDTA 对重组 SyGDH 酶活性的影响。

1.8.4 辅酶的依赖性 根据 1.6 中方法,以 100 mmol/L 的 D-葡萄糖为底物,分别以 NAD^+ 和 NADP^+ 为辅酶,在不同辅酶浓度(2.0~100 mmol/L)下测定重组 SyGDH 的酶活性。采用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合,计算重组 SyGDH 对不同辅酶的动力学参数,以确定其对不同辅酶的亲和力,从而确定重组 SyGDH 对辅酶的依赖性。

1.8.5 有机溶剂稳定性 将纯化后重组 SyGDH 与等体积的不同有机溶剂(二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、苯乙酮、丙酮、乳酸乙酯、石油醚、乙酸乙酯、正辛烷、正己烷、环己烷、异丙醇、正戊醇、正丁醇、乙醇、甲醇)混合,于 37 °C、200 r/min 的摇床中振荡 1 h,按照 1.6 中方法测定残余酶活性,计同样条件下只加缓冲液处理的酶的活性为 100%,当残余酶活力为 50%以下,即定义为有机溶剂对酶有明显抑制作用,以此来衡量重组 SyGDH 对所测不同有机溶剂的耐受性。

1.8.6 底物谱分析及动力学参数 按照 1.6 中方法,分别以 D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖、麦芽糖、蔗糖和 D-葡萄糖为底物,测定重组 SyGDH 的相对酶活性,将最高相对酶活性所对应的底物定为最适底物。以不同浓度(0.5~5.0 mmol/L)的 D-葡萄糖为底物,按照 1.6 中方法测定酶活力,采用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合,计算重组 SyGDH 对于 D-葡萄糖的 K_m 和 V_{max} 值。

1.9 辅酶 NADPH 的再生验证

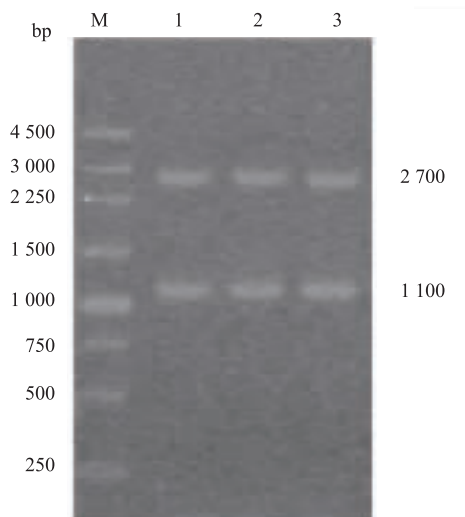
按照 1.5 方法培养 *E. coli* BL21/pET28a-SI,诱导表达重组羧基还原酶。偶联辅酶再生反应体系:在 2 mL 磷酸盐缓冲液(100 mmol/L,pH 6.5)中,加入 0.1 g 重组 SyGDH 湿菌体、0.1 g 重组羧基还原酶湿菌体,含有终浓度 100 mmol/L D-葡萄糖、2 mmol/L NADPH、4 mmol/L 4-氯乙酰乙酸乙酯;在 37 °C、220 r/min 条件下反应 10 h 后,加入 2 mL 乙酸乙酯,充分振荡混匀后,10 000 r/min 离心 10 min,取上层有机相,无水硫酸镁干燥,过 0.22 μm 有机膜后用于气相色谱检测,分析产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯得率;同样条件下,以 0.2 g *E. coli* BL21/

pET28a 湿菌体代替双菌作为阴性对照 1;用 0.2 g 重组羧基还原酶湿菌体构建单酶催化还原反应体系作为阴性对照 2,测定产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯得率。

2 结果与讨论

2.1 嗜酸热原体葡萄糖脱氢酶表达载体构建

通过密码子优化后获得重组质粒 pUCm-T-Sygdh,经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切,产物经琼脂糖凝胶电泳分析,可见大小约为 2 700 bp 和 1 100 bp 的条带,分别为线性化的 pUCm-T 和目的基因 Sygdh(图 1),与目的基因理论大小(1 121 bp)相符。将 Sygdh 与同样双酶切的 pET28a 进行连接,转化 *E. coli* BL21。经 T7 通用引物鉴定后,筛选得到阳性重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-Sygdh,测序结果与预期相符。对质粒 pET28a-Sygdh 进行 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳分析可见约 1 100 bp 的条带,与理论大小相符(图 2)。优化后的基因序列 Sygdh 已提交 GenBank 数据库,登录号为 KF739810。



M:250 bp DNA marker;

1—3:pUCm-T-Sygdh *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切产物

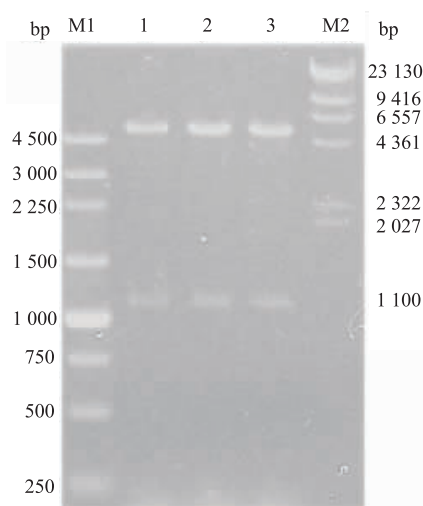
图 1 pUCm-T-Sygdh 的 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切产物电泳图

Fig. 1 Double digestion of pUCm-T-Sygdh by *Nco* I and *Hind* III

2.2 重组 SyGDH 的表达、鉴定和纯化

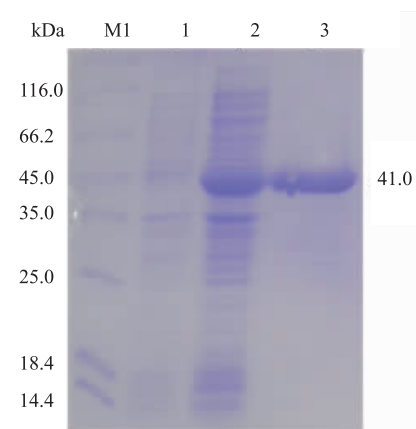
重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-Sygdh 和阴性菌 *E. coli* BL21/pET28a,经 1.0 mmol/L 的 IPTG 于 25 °C 诱导 12 h 后,SDS-PAGE 结果显示,与对照 *E. coli*

BL21/pET28a 相比 (图 3, 泳道 1), 重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*Sygdh* 的表达产物在表观相对分子质量 41.0 kDa 处有明显的蛋白质条带 (图 3, 泳道 2)。利用 Band Scan 软件分析 SDS-PAGE 电泳图, 重组菌中目标蛋白质表达量占全菌可溶性蛋白质的 32.0%。重组菌经超声破碎、离心获得粗酶液, 粗酶液经镍离子亲和层析纯化, SDS-PAGE 结果显示蛋白质为单一条带 (图 3, 泳道 3), 并测得其比活性为 4.5 U/mg, 而 *E. coli* BL21/pET28a 中并未检测到葡萄糖脱氢酶活性。结果表明, *Sygdh* 基因在大肠杆菌中实现了高效表达。



M1: 250 bp DNA marker; 1—3: pET28a-*Sygdh* 双酶切产物; M2: λ -*Hind* III digest DNA Ladder Marker

图 2 pET28a-*Sygdh* 的 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切产物电泳图
Fig. 2 Double digestion of pET28a-*Sygdh* by *Nco* I and *Hind* III



M: 蛋白质 marker; 1: pET28a 酶液;
2: 重组 SyGDH 粗酶液; 3: 重组 SyGDH 纯酶

图 3 重组 SyGDH 的 SDS-PAGE 分析图
Fig. 3 SDS-PAGE Analysis of the recombinant SyGDH

2.3 重组 SyGDH 的酶学性质

2.3.1 最适 pH 及其稳定性 按照 1.8.1 中的方法测定酶的最适 pH 及 pH 稳定性, 结果见图 4, 重组 SyGDH 的最适 pH 值为 7.5, 当 pH<6.0 或者 pH>7.5 时, 酶活力下降较快; 该重组酶在 pH 6.0~8.0 范围内稳定, 在 pH 6.0~8.0 下孵育 1 h 后, 残余酶活力仍保持在 80% 以上。

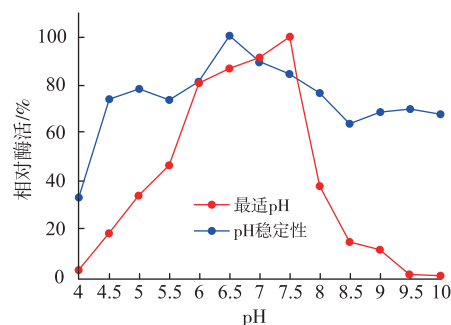


图 4 pH 值对重组 SyGDH 酶活力的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity of the recombinant SyGDH

2.3.2 最适反应温度及其稳定性 按照 1.8.2 中的方法测定酶的最适反应温度及其稳定性, 结果表明该酶在 30~50 °C 范围内催化活性较高, 最适反应温度为 40 °C, 见图 5(a); 在 55 °C 以下稳定, 在该温度下处理 1 h 残余酶活力仍能达到 98.0% 以上, 该酶在 60 °C 下处理 1 h 后, 残余酶活力为 82.2%, 见图 5(b), 表明该酶在较高温度下可长时间保持稳定。

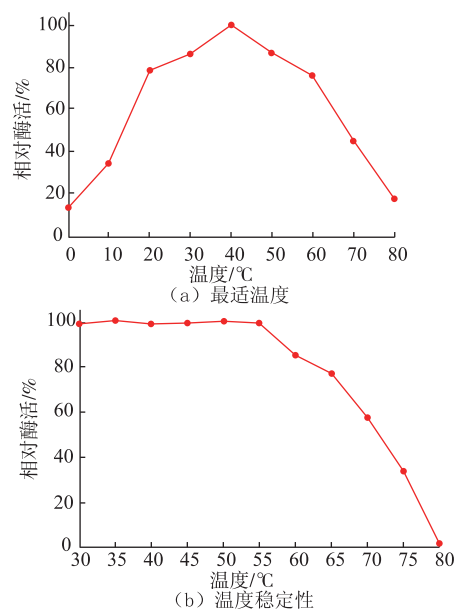


图 5 重组 SyGDH 的最适温度及温度稳定性

Fig. 5 Optimal temperature and thermostability of the recombinant SyGDH

2.3.3 金属离子和 EDTA 对重组 SyGDH 的影响

所测不同金属离子及 EDTA 对重组 SyGDH 酶活性的影响如图 6 所示。结果表明, Zn^{2+} 对该酶有明显促进作用(相对酶活力 > 115.0%), Cu^{2+} 有明显的抑制作用(相对酶活力为 50%), 其他金属离子和 EDTA 对该酶的活性影响不大。

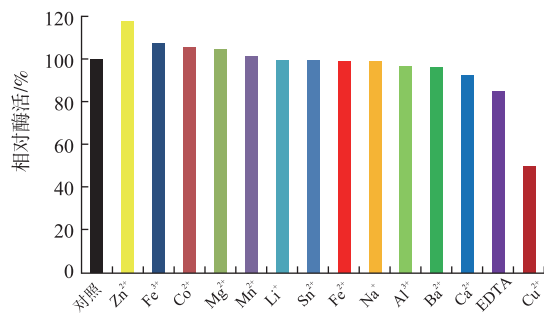


图 6 金属离子和 EDTA 对重组 SyGDH 酶活的影响

Fig. 6 Effects of various metal ions and EDTA on the activity of the recombinant SyGDH

2.3.4 辅酶依赖性 利用 Origin 8.0 软件对所测数据进行非线性拟合, 得到重组 SyGDH 对两种辅酶的动力学参数: 该酶催化 NADP^+ 的 $V_{\max}$ (14.9 U/mg) 小于催化 NAD^+ 的 $V_{\max}$ (25.7 U/mg), 但该酶催化 NADP^+ 的 K_m 值为 4.6 mmol/L, 明显低于催化 NAD^+ 的 K_m (157.9 mmol/L), 且催化 NADP^+ 的 K_{cat}/K_m 值为 2 213.2 L/(s·mmol), 是催化 NAD^+ 的 20 倍。结果表明, 重组 SyGDH 为 NAD^+ 、 NADP^+ 双辅酶依赖型葡萄糖脱氢酶, 且该酶对 NADP^+ 有较强的亲和力。

2.3.5 有机溶剂耐受性 有机溶剂对重组 SyGDH 活力影响结果如图 7 所示, 重组 SyGDH 在丙酮、异丙醇中放置 1 h 后, 酶活力仍保持在 90% 以上; 在乙醇、二甲基甲酰胺、正辛烷、甲醇、石油醚、环己烷、乙酸乙酯中的残留酶活力都在 50% 以上; 在苯乙酮、正丁醇、正戊醇、二甲基亚砆中 1 h 后的残留酶活较低, 分别为 48.3%、48.0%、39.0%、35.1%, 说明该酶对部分有机溶剂具有耐受性。

2.3.6 底物谱分析及动力学参数 葡萄糖脱氢酶的底物谱分析结果显示, 重组 SyGDH 对 D-半乳糖 (D-葡萄糖 C4 的差相异构体) 的催化活性是 D-葡萄糖催化活性的 90.3%, 而对其他底物均未检测到活性。这一结果与 Angelov^[15] 报道的具有双底物特异性的葡萄糖/半乳糖脱氢酶的性质相似。重组 SyGDH 对 D-葡萄糖的 K_m 和 $V_{\max}$ 值分别为 28.2 mmol/L 和 6.5 U/mg。

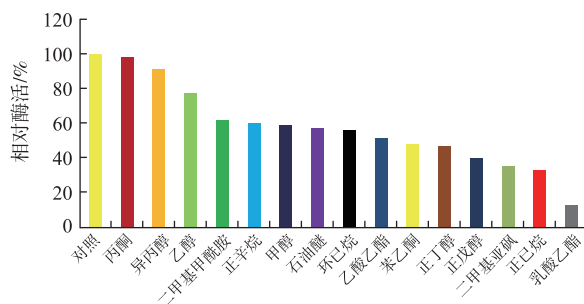


图 7 有机溶剂对重组 SyGDH 酶活力的影响

Fig. 7 Effects of organic solvents on the recombinant SyGDH activity

2.4 辅酶 NADPH 的再生验证

利用重组 SyGDH 和重组羧基还原酶构建偶联辅酶再生体系。结果表明: 阴性对照 1, 见图 8(a), 未能检测到产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯; 阴性对照 2, 见图 8(b), 检测到产物的产率为 31.8%; 偶联辅酶再生体系, 见图 8(c), 检测到产物的产率达到 99.0%, 是未添加重组 SyGDH (阴性对照 2) 时产物产率的 3.11 倍。验证了重组 SyGDH 具有为生物催化氧化还原反应提供辅酶 NADPH 再生的能力。

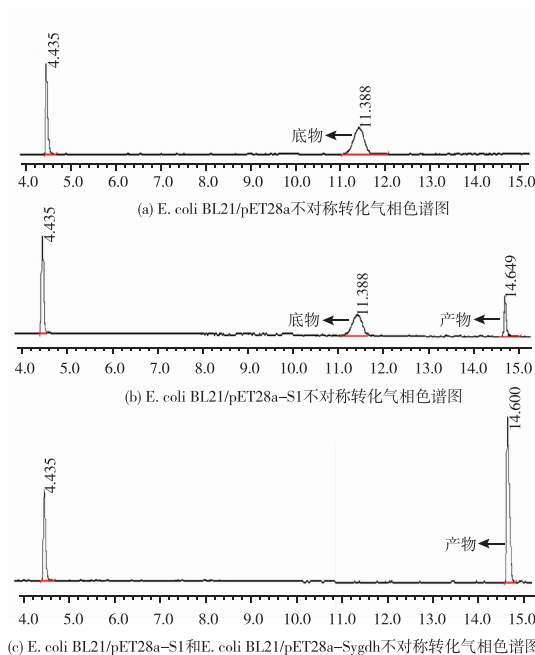


图 8 产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯产率的气相色谱图

Fig. 8 Yield of ethyl 4-chloro-3-hydroxybutyrate determined by GC

3 结语

由于耐有机溶剂葡萄糖脱氢酶在生物催化中

具有重要的应用价值,通过基因工程实现葡萄糖脱氢酶异源高效表达是降低其工业应用成本、适应工业应用的有效手段^[16]。作者成功实现了嗜酸热源体中葡萄糖脱氢酶基因 *Sygdh* 在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达。酶学性质研究表明,重组 SyGDH 的耐有机性和耐高温性与 Smith^[7]等分离得到的野生型葡萄糖脱氢酶一致,与 Zhang^[5]等和 Ding^[6]等克隆的葡萄糖脱氢酶相比,其热稳定性和耐有机

溶剂性质均较好,具有适合于工业应用的理想特性。在构建重组葡萄糖脱氢酶与羰基还原酶偶联辅酶再生体系中,添加重组 SyGDH 时产物 4-氯-3-羟基丁酸乙酯的产率达到 99.0%,是未添加重组 SyGDH 时产物产率的 3.11 倍,表明重组 SyGDH 能为生物催化氧化还原反应提供辅酶 NADPH 的再生。同时,本研究也为解决有机溶剂中生物催化氧化还原反应辅酶限制问题奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Liu W F, Wang P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis[J]. **Biotechnology Advances**, 2007, 25(4):369.
- [2] Ye Q, Cao H, Mi L, et al. Biosynthesis of (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate ethyl using *Escherichia coli* co-expressing a novel NADH-dependent carbonyl reductase and a glucose dehydrogenase[J]. **Bioresource Technology**, 2010, 101(22):8911-8914.
- [3] Gao C, Zhang L J, Xie Y J, et al. Production of (3S)-acetoin from diacetyl by using stereoselective NADPH-dependent carbonyl reductase and glucose dehydrogenase[J]. **Bioresource Technology**, 2013, 137:111-115.
- [4] Stepankova V, Damborsky J, Chaloupkova R. Organic co-solvents affect activity, stability and enantioselectivity of haloalkane dehalogenases[J]. **Biotechnology Journal**, 2013, 8(6):719-729.
- [5] 张波涛, 张荣珍, 王磊, 等. 芽胞杆菌(*Bacillus* sp) YX-1 耐有机溶剂葡萄糖脱氢酶的基因克隆与酶学性质[J]. **微生物学报**, 2013, 53(6):561-568.
ZHANG Botao, ZHANG Rongzhen, WANG Lei, et al. Gene cloning and characterization of a solvent-resistant glucose dehydrogenase from *Bacillus* sp. YX-1[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2013, 53(6):561-568. (in Chinese)
- [6] Ding H T, Du Y Q, Liu D F, et al. Cloning and expression in *E. coli* of an organic solvent-tolerant and alkali-resistant glucose 1-dehydrogenase from *Lysinibacillus sphaericus* G10[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(2):1528-1536.
- [7] Smith L D, Budgen N, Bungard S J, et al. Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*[J]. **Biochemical Journal**, 1989, 261(3):973-977.
- [8] Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction [J]. **Tetrahedron-Asymmetry**, 2009, 20(5):513-557.
- [9] Klivanov A M. Improving enzymes by using them in organic solvents[J]. **Nature**, 2001, 409(6817):241-246.
- [10] Hernaiz M J, Alcantara A R, Garcia J I, et al. Applied biotransformations in green solvents[J]. **Chemistry**, 2010, 16(31):9422.
- [11] Clouthier C M, Pelletier J N. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis [J]. **Chemical Society Reviews**, 2012, 41(4):1585-1605.
- [12] Ruepp A, Graml W, Santos M M L, et al. The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*[J]. **Nature**, 2000, 407(6803):508-513.
- [13] 金光泽, 段作营, 张莲芬, 等. 重组融合人血清白蛋白-人白介素-2C125A 突变体在毕赤酵母中的表达[J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(4):595-601.
JIN Guangze, DUAN Zuoying, ZHANG Lianfen, et al. Expression of the fusion protein human serum albumin/mutant human interleukin 2C125A in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(4):595-601. (in Chinese)
- [14] Park H J, Jung J, Choi H, et al. Enantioselective bioconversion using *Escherichia coli* cells expressing *Saccharomyces cerevisiae* reductase and *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2010, 20(9):1300.
- [15] Angelov A, Futterer O, Valerius O, et al. Properties of the recombinant glucose/galactose dehydrogenase from the extreme thermoacidophile, *Picrophilus torridus*[J]. **FEBS Journal**, 2005, 272(4):1054-1062.
- [16] Carrea G, Riva S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents [J]. **Angewandte Chemie-International Edition**, 2000, 39(13):2226-2254.