

点突变提高甲酸脱氢酶(CbFDH)的酶活和催化效率

郑俊贤, 王子渊, 杨套伟, 张 显, 徐美娟, 饶志明*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 甲酸脱氢酶(FDH)是工业上常用的辅酶 NADH 再生酶,而天然的 FDH 主要缺陷是酶活和催化效率低。作者通过序列比对 7 种不同来源的 FDH,发现其中来源于 *Candida boidinii* 的 FDH 的第 93 位氨基酸为缬氨酸(V),而其余 6 种来源均为异亮氨酸(I)。进一步根据疏水性大小,构建 4 个突变体酶 V93L、V93I、V93A 和 V93G。酶学性质研究表明,除了 V93L 外,突变体酶的酶活随着第 93 位氨基酸残基的疏水性增强而提高。其中,V93I 的比酶活提高 22.6%、催化效率(NAD⁺)提高了 133%。利用 V93I 偶联 L-亮氨酸脱氢酶用于不对称还原 2-氧代戊酸合成 L-正缬氨酸,结果表明 V93I 能够提高 2-氧代戊酸的转化效率。

关键词: 甲酸脱氢酶;疏水性;定点突变;催化效率;L-正缬氨酸

中图分类号:Q 786 文章编号:1673-1689(2019)03-0001-09 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.001

Improving the Activity and Catalytic Efficiency of Formate Dehydrogenase (CbFDH) by Site-Directed Mutagenesis

ZHENG Junxian, WANG Ziyuan, YANG Taowei, ZHANG Xian, XU Meijuan, RAO Zhiming*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Formate dehydrogenase (FDH) is an industrial enzyme widely used for NADH regeneration. However, the low activity and low catalytic efficiency are flaws of native FDH. In this study, amino acid sequences alignment of FDH from different sources was conducted. The result showed that the 93-site amino acid of *Candida boidinii* FDH (CbFDH) was valine (V), while that of others were isoleucine (I). Moreover, according to the hydrophobicity, four mutant enzymes V93L, V93I, V93A and V93G were constructed. The enzymatic properties showed that the activity of mutants was improved as the enhancement of 93-site amino acids hydrophobicity, except mutant V93L. And the activity and catalytic efficiency (for NAD⁺) of V93I were increased by 22.6% and 133%, respectively. Mutant V93I and L-leucine dehydrogenase were used to synthesize L-norvaline by asymmetric reduction of α -ketovaleric acid. The results showed that the conversion efficiency of α -ketovaleric acid was improved with mutant V93I.

收稿日期: 2017-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570085); 国家 863 计划项目(2015AA021004); 江苏省杰出青年基金项目(BK20150002); 江苏省自然科学基金项目(BK20161292); 江苏高等教育机构优先学科课程发展项目。

作者简介: 郑俊贤(1990—),男,发酵工程博士研究生,主要从事工业微生物与酶工程方面的研究。E-mail:7150201044@vip.jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 饶志明(1975—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事工业微生物与代谢工程方面的研究。E-mail:raozhm@jiangnan.edu.cn

引用本文: 郑俊贤,王子渊,杨套伟,等. 点突变提高甲酸脱氢酶(CbFDH)的酶活和催化效率[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(03):1-9.

Keywords: formate dehydrogenase, hydrophobicity, site-directed mutagenesis, catalytic efficiency, L-norvaline

甲酸脱氢酶 (Formate dehydrogenase, FDH, EC 1.2.1.2) 属于 D-2-羧基酸脱氢酶类, 催化甲酸氧化成 CO_2 , 同时伴随着 NAD^+ 还原为 $\text{NADH}^{[1-2]}$ 。大多数的甲基营养型微生物中都含有甲酸脱氢酶, 如可以利用甲醇的酵母菌以及一些细菌、真核生物、高等植物等^[1]。它是一种非常保守的酶, 在所有来源的酶中, 绝对保守的氨基酸残基有 60 个^[2], 且对于一些进化距离比较远的微生物物种如: *Pseudomonas* sp. 101、*Hansenula polymorpha* 和 *Solanum tuberosum* 来源的 FDH, 其氨基酸序列同源性高达 45%, 而与催化或辅酶和底物结合相关的氨基酸残基在 FDH 中更为严格保守^[3]。因此, 参考大多数物种在关键区域的氨基酸序列, 利用同源序列比对, 对某种来源的 FDH 进行改造, 具有较高的可靠性。

FDH 催化还原 NAD^+ 的反应关键在于增强了 NAD^+ 的 C4N 部分的亲电性质。反应中, 负氢离子脱离甲酸并攻击 NAD^+ 的带正电荷亲电 C4N 部分, 结果产生了两种中性物质 CO_2 和 $\text{NADH}^{[4]}$ 。该反应需要在避免水分子干扰的密闭环境中进行, 同时 FDH 的结构也为此提供了良好的疏水中心^[4-5]。

随着蛋白质结晶技术的发展, 越来越多的 FDH 三维结构得到解析, 对深入探索蛋白质结构和功能之间的联系有着重要的作用; 另外, 对 FDH 催化机理的研究也在不断增多, 在酶催化过程中起关键作用的氨基酸残基位点也多有报道^[6-8], 这有利于通过理性设计并利用蛋白质工程对 FDH 的特性进行改造。已报道对 FDH 的改造主要集中在以下几个方面: 改变辅酶特异性^[9-11]、提高酶活^[12-13]、提高酶的稳定性等方面^[14-15]。

由于 FDH 的催化反应具有不可逆、底物廉价和副产物容易去除等优势, 因此常被用作辅酶 NADH 再生酶与其他氧化还原酶组合用于羧基酸、手性醇、氨基酸等重要光学活性化合物的生物转化生产, 而这些产品广泛应用于食品、医药及各种添加剂中^[16]。最具代表性的是来源于博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*) 的甲酸脱氢酶 CbFDH, 在上世纪已经被用来与亮氨酸脱氢酶偶联用于手性 L-叔亮氨酸的工业化生产^[17]。然而, 野生型 CbFDH 酶活低,

与亮氨酸脱氢酶、乳酸脱氢酶及乙醇脱氢酶等组合时, 辅酶 NADH 再生供应不足, 造成产品转化效率不高^[18]。

作者通过多种来源的甲酸脱氢酶序列比对获得关键保守位置的差异点 (第 93 位氨基酸残基), 该位点位于底物的通道入口, 其疏水性可能会影响 FDH 的催化活性, 因此, 对存在差异的 CbFDH 的 V93 位点进行疏水性改造及分析, 同时对获得的突变体酶进行酶学性质研究及动力学参数研究。其中突变体酶 V93I 在酶活、比酶活和催化效率上均有所提高, 该酶进一步被用于 L-正缬氨酸的不对称合成, 结果表明了该突变体酶能够提高体系的转化效率从而缩短底物完全转化的时间, 具有较强的开发和应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 表达宿主菌 *E. coli* BL21 和重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*fdh*: 由作者所在实验室保存; 表达质粒 pET-28a (含卡那霉素抗性): 购自 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂 PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶、限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶: 均购于 TaKaRa 公司 (大连); ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒: 购于南京诺唯赞; 胶回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒: 均购于 Generay 公司; Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒: 购于生工 (上海) 生物工程有限公司; 酵母提取物、胰蛋白胨: 购于 OXOID (英国); 其他均为国产分析纯。

1.1.3 培养基 LB 液体培养基 (组分 g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10; pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min; LB 固体培养基为在液体培养基基础上添加质量浓度 20 g/L 的琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 基因定点突变和重组质粒的构建 以实验室已构建的重组质粒 pET28a-*fdh* 为模板, 设计点突变引物, 见表 1。通过重叠延伸 PCR 引进突变点^[19]。

表1 基因克隆及定点突变引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis and gene cloning

引物名称	引物序列(5'-3')
FDH _{Bam} HIF	CAGCAAATGGCTCGCGGATCCATGAAGATCG TTTACTCTTATAC
FDH _{Hind} IIIR	CTCGACTGCGGCCGCAAGCTTTTATTTCTTATC GTGCTTACCATAA
V93I834F	GTTGTCGTCGCTGCTATTGTTTCTGATCATATT
V93I294R	AATATGATCAGAACCAGTACCAGCGACGACA AC
V93L834F	GTTGTCGTCGCTGCTTTAGGTTCTGATCATATT
V93L294R	AATATGATCAGAACCCTAACCAGCGACGACA AC
V93A834F	GTTGTCGTCGCTGCTGTCAGGTTCTGATCATATT
V93A294R	AATATGATCAGAACCCTGCCAGCGACGACA AC
V93G834F	GTTGTCGTCGCTGCTGCTGTTTCTGATCATATT
V93G294R	AATATGATCAGAACCCTACCCAGCGACGACA AC

注:加粗斜体为酶切位点,下划线为突变位点。

按照 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒说明书,将重叠延伸得到的 PCR 产物及表达质粒 pET28a 的双酶切(*Bam*HI 和 *Hind*III)产物按一定的比例混合连接,然后导入感受态 *E. coli* BL21 中,挑单克隆提取质粒,并进行测序。保存含经测序验证正确的重组质粒的菌株。

1.2.2 突变体酶的表达和纯化 重组菌接种于 10 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中培养 12 h。然后以 1%的接种体积分数将其接至 50 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中培养 4 h,条件为 37 ℃、180 r/min。之后加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,诱导条件为 30 ℃、160 r/min,诱导时间为 16 h。离心收集细胞,并用 PBS(pH 7.5,浓度为 0.05 mol/L)缓冲液洗涤 2 次后悬浮。然后使用超声破碎仪对细胞进行破碎,温度控制在 4 ℃。将破碎液在 4 ℃、14 000 r/min 条件下离心 20 min 去除细胞破碎杂质,用于纯化。

蛋白质纯化的方法是采用镍柱亲和层析,具体参照文献[13]所述方法。

1.2.3 突变体酶酶活的测定 突变体酶酶活测定采用紫外分光光度法测定^[13,20]。反应预混液中含有浓度为 0.167 mmol/L 甲酸钠溶液(由 PBS 浓度为 0.05 mol/L,pH 7.5 配制)和浓度为 1.67 mmol/L

NAD⁺。加入 10 μL 适量稀释的待测样品,启动反应并计时,在 340 nm 下每 30 秒记录一次吸光值。以不同浓度的 NADH 做标准曲线,计算每分钟产生的 NADH 的量。酶活定义为:每分钟产生摩尔质量为 1 μmol NADH 所需的酶量为 1 个酶活单位。

1.2.4 突变体酶的酶学性质研究 最适温度:在 pH 7.0 条件下,将 10 μL 适量稀释纯酶液添加到反应预混液中,将反应体系分别置于 35、40、45、50、55 ℃下反应,按 1.2.3.所述方法测定酶活。设定最高酶活为 100%,计算各个温度下的相对酶活,获得该酶的最适反应温度。

最适 pH: 将 10 μL 适量稀释纯酶液添加到不同 pH 的缓冲溶液中(pH 5.0~6.0,浓度为 0.05 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;pH 7.0~8.0,浓度为 0.05 mol/L 的 PBS 缓冲液;pH 9.0~10.0,浓度为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液;pH 10.0~11.0,浓度为 0.05 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液),于 30 ℃下测定酶活。设定最高酶活为 100%,计算各个 pH 下的相对酶活,获得该酶的最适反应 pH。

温度稳定性: 将适量稀释纯酶液于 60 ℃下孵育,每 2 分钟取样。在最适条件下测定酶活,以初始酶活为 100%,计算处理后各样品的相对酶活,考察突变体酶的温度稳定性。

pH 稳定性:将适量稀释纯酶液加入到 pH 3~12 的缓冲溶液中(其中 pH 3.0~5.0,浓度为 0.05 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;pH 11.0~12.0,浓度为 0.05 mol/L 的 Na₂HPO₄-NaOH 缓冲液,其余缓冲液同最适 pH)于 30 ℃下孵育 1 h,然后在最适条件下测定各样品的剩余酶活。以初始酶活为 100%,计算处理后各样品的相对酶活,考察突变体酶的 pH 稳定性。

1.2.5 动力学参数测定 对于底物 NAD⁺的米氏常数 K_m 测定,固定甲酸钠的浓度为 200 mmol/L,配制不同浓度的 NAD⁺溶液,加入适量纯酶液,在最适条件下检测反应初速度。同样地,对于底物甲酸的米氏常数 K_m 测定,固定 NAD⁺的浓度为 10 mmol/L 配制不同浓度的甲酸钠溶液,加入适量纯酶液,在最适条件下检测反应初速度。利用 Origin 8.0 软件拟合相应测得的数据,从而获得两个底物的 K_m 和 k_{cat} 值。

1.2.6 圆二色谱分析 野生型酶 CboFDH 和突变体酶的圆二色性分析在圆二色谱仪(MOS-450/AF-

CD-STP-A)上进行。将待测样品用超纯水稀释至质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 然后加入一个 1 nm 光径的适量比色皿中, 使用圆二色谱仪在光谱范围为 190~250 nm 的紫外光谱区扫描蛋白质样品, 扫描速度为 120 nm/min。扫描结果在 Dichroweb 服务器上进行分析 (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>)。

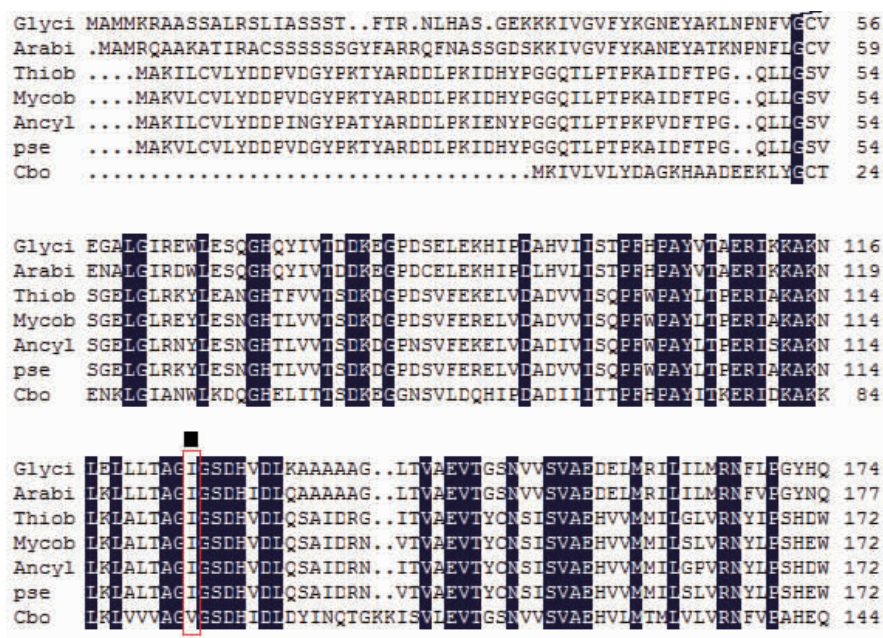
1.2.7 三维结构模拟及分析 CbFDH 的三维结构 PDB (5dn9) 文件从 RCSB 数据库获得。使用 Discovery Studio 2.5 分析突变体酶的分子内相互作用力的改变情况。利用 PYMOL 软件进行结构处理和图形制作。

1.2.8 L-正缬氨酸的不对称合成 L-正缬氨酸的不对称合成体系为 25 mL 的转化体系, 其中含有: 浓度为 20 mmol/L 的 2-氧代戊酸, 浓度为 20 mmol/L 的甲酸胺, 浓度为 0.3 mmol/L 的 NAD^+ , 体积酶活为 2 U/mL 的亮氨酸脱氢酶及质量浓度为 0.1 mg/mL 的 CbFDH 或者是 V93I。转化条件为 pH 7.5 (浓度为 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液), 温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 每间隔 0.5 小时取一次样。底物和产物的浓度测定采用 HPLC, 具体方法参见文献[21]。

2 结果与分析

2.1 突变位点的选择

如图 1, 通过比对 7 种不同来源的甲酸脱氢酶, 分别来源于 *Glycine max*、*Arabidopsis thaliana*、*Thiobacillus* sp、*Mycobacterium vaccae*、*Ancylobacter aquaticus*、*Pseudomonas* sp.101 和 *Candida boidinii*。发现其中来源于 *C. boidinii* 的甲酸脱氢酶 (CbFDH) 的第 93 位氨基酸残基为缬氨酸 (V) 而其余 6 种来源的甲酸脱氢酶均为异亮氨酸 (I)。同时该位点位于 CbFDH 的一个保守序列 AGI/VGSDH 区域中。有研究表明, 氢质子的转移需要避免水分子的干扰, 而 FDH 的催化本质就是 NAD^+ 和甲酸离子之间的质子转移^[4]。通过对 CbFDH 的 PDB (5dn9) 模型进行分析发现, V93 位点正好位于 CbFDH 的底物通道入口, 保护着酶的催化反应中心, 见图 2。而 CbFDH 反应中心入口的疏水性极有可能会影响 NAD^+ 的质子接收及 NAD^+ 的结合, 从而影响 CbFDH 的酶活和催化效率。因此, 我们选择对 V93 位点的疏水性进行改造, 设计了 4 个突变体酶 V93I、V93A、V93L 和 V93G, 其中氨基酸疏水性由大到小排序为: Ile>Val>Leu>Ala>Gly。



Glycine max (Glyci), Arabidopsis thaliana (Arabi), Thiobacillus sp (Thiob), Mycobacterium vaccae (Mycob), Ancylobacter aquaticus (Ancyl), Pseudomonas sp.101 (Pse) 和 Candida boidinii (Cbo)

图 1 不同来源的甲酸脱氢酶氨基酸序列比较

Fig. 1 Sequences alignment of formate dehydrogenase from different bacteria

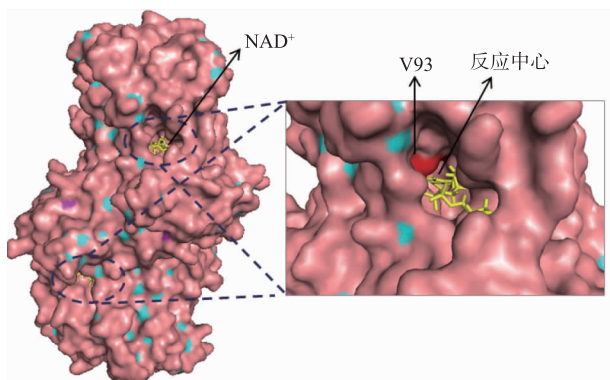


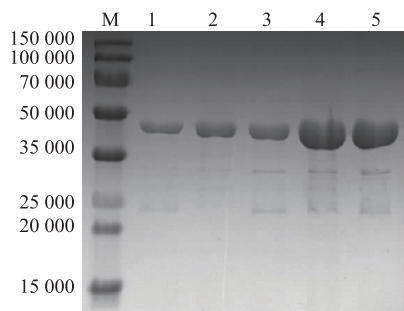
图2 *Candida Boidinii* 来源的甲酸脱氢酶的三维结构分析
Fig. 2 Three-dimensional structure analysis of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*

2.2 突变体酶的构建、表达及纯化

利用重叠延伸 PCR 获得突变体酶基因,通过 ClonExpress II One Step Cloning Kit 将突变基因连接到表达载体 pET28a (+) 上,获得重组质粒 pET28a -V93I、pET28a -V93L、pET28a -V93A 和 pET28a-V93G,并通过 PCR 和测序验证质粒的正确性。然后将正确的重组质粒导入到 *E. coli* BL21 获得重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a -V93I、*E. coli* BL21/pET28a-V93L、*E. coli* BL21/pET28a-V93A 和 *E. coli* BL21/pET28a-V93G。

按照 1.2.2 所述方法诱导表达,然后离心收集细胞,用超声破碎仪破碎并离心去除细胞破碎沉淀,破碎上清液即为重组菌表达后的粗酶液。进一步利用镍柱纯化,得到突变体酶和野生型的纯酶样品。所有样品经处理后,进行 SDS-PAGE 电泳分析,见图 3。得到的突变体酶的蛋白质相对分子质量大小为 40 300,符合 CbFDH 利用载体 pET28a(+) 表达后的大小。同时可以看出,除了 V93I,其余突变体酶的蛋白质质量浓度比野生型酶有所下降。进一步对突变体酶的酶活、比酶活及蛋白质质量浓度进行测定,结果见表 2。表明突变体酶 V93I 的体积酶活为 19.37 U/mL,比野生型提高 34.7%,比酶活为 6.39 U/mg,相比野生型提高 22.6%。突变体酶 V93A 和 V93 相比野生型,酶活分别降低 66%和 92.9%,比酶活分别下降 26.1%和 79.8%。而 V93G 已经完全失活,在之后酶学性质研究中将不再涉及。上述结果可以看出,CbFDH 酶活随着 V93 位氨基酸残基疏水性的增强而提高(突变体酶 V93L 除外),其中 V93I 的酶活和比酶活均为最高,相比野生型酶更加

有优势。



M:蛋白质标准品;1:V93G;2:V93L;3:V93A;4:V93I;5:FDH 野生型。

图3 突变体酶及野生型酶纯化后的蛋白质 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified protein of the wild-type enzyme and its variants

表 2 突变体酶的酶活及比酶活测定

Table 2 Determination of enzyme activity and specific activity of mutant enzyme

样品	酶活/ (U/mL)	蛋白质质量 浓度/(mg/mL)	比酶活/ (U/mg)
CbFDH	14.38±0.64	2.76±0.17	5.21±0.59
V93I	19.37±0.71	3.03±0.21	6.39±0.69
V93A	4.82±0.20	1.25±0.09	3.85±0.47
V93L	1.02±0.09	0.97±0.20	1.05±0.39
V93G	0	nd	nd

注:nd 表示没有测量。

2.3 突变体酶的酶学性质研究

对甲酸脱氢酶野生型及其突变体酶的最适 pH 进行研究,结果见图 4。表明突变体酶 V93I 的最适 pH 与野生型保持一致,均为 9,而突变体酶 V93A、V93L 最适 pH 为 7。

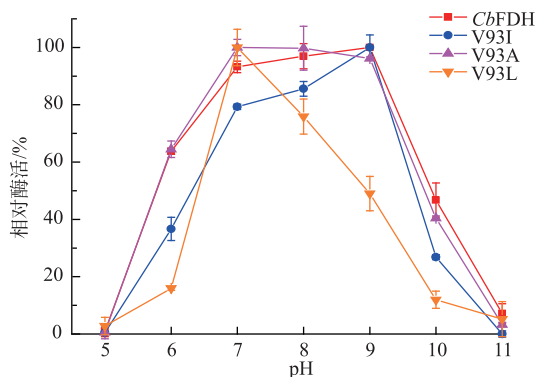


图4 突变体酶和野生型酶的最适 pH

Fig. 4 Optimal pH of the wild-type enzyme and its variants

同时对甲酸脱氢酶野生型及其突变体的最适温度进行研究,结果见图5。突变体酶 V93I 与 V93A 的最适温度与野生型酶相同,均为 45 °C,而突变体酶 V93L 的最适温度有所下降,为 40 °C。

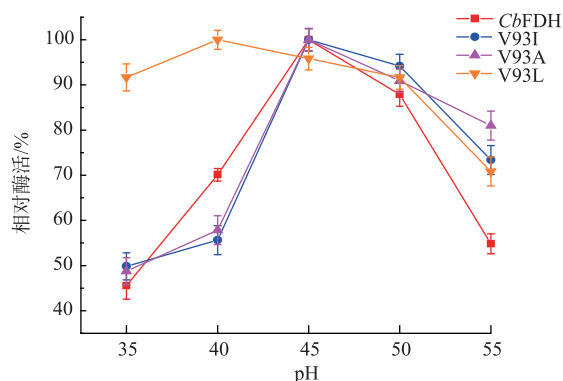


图5 突变体酶和野生型酶的最适反应温度

Fig. 5 Optimal temperature of the wild-type enzyme and its variants

将突变体酶和野生型 CbFDH 孵育在不同 pH 溶液中 1 h 后,在最佳条件下测定残余酶活来研究突变体酶的 pH 稳定性。突变体酶 V93I 在酸性和碱性条件下的 pH 稳定性强于野生型,而另外两个突变体酶 V93A 和 V93L 则稍微有些下降,特别是 V93L 在碱性条件下稳定性下降的幅度相对较大,见图6。

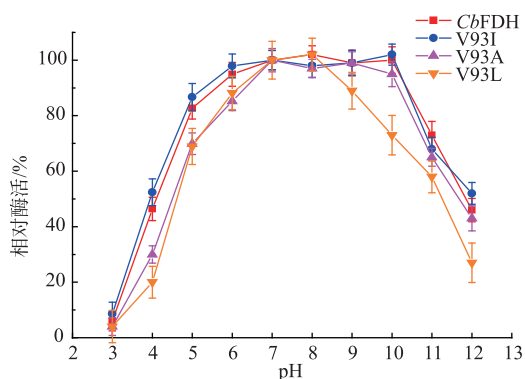


图6 突变体酶和野生型酶 pH 稳定性

Fig. 6 pH stability of the wild-type enzyme and its variants

由于甲酸脱氢酶在 55 °C 下比较稳定,24 h 内基本不失活^[13],因此为了在最短的时间能确定突变体酶的稳定性是否提高,我们在 60 °C 下测定野生型酶及其突变体酶的热稳定性,结果见图7。除了突变体酶 V93A 的热稳定性相比野生型略强外,其他两个突变体的热稳定性则有所下降,但是不是特别

明显。

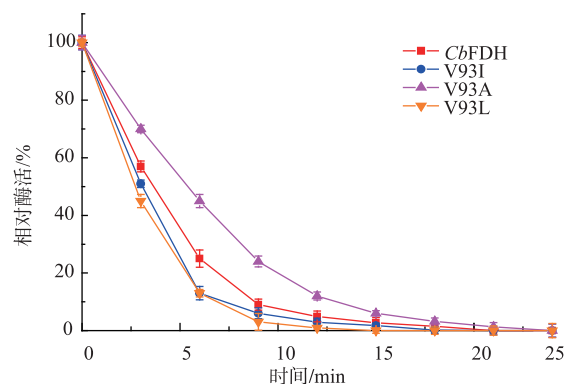


图7 突变体酶和野生型酶的温度稳定性

Fig. 7 Thermostability of the wild-type enzyme and its variants

2.4 圆二色谱分析突变前后 CbFDH 二级结构

利用圆二色谱分析检测突变体酶和野生型酶,比较突变体酶的二级结构是否发生变化,结果见图8。野生型酶及其突变体酶的远紫外圆二色谱(190~250 nm)基本一致,同时将圆二色谱数据提交到在线服务(Dichroweb server)分析,结果表明突变体酶的二级结构(α -螺旋、 β -折叠、无规卷曲等)均未发生明显变化,说明 V93 位点突变基本不会对 CbFDH 的二级结构造成影响。

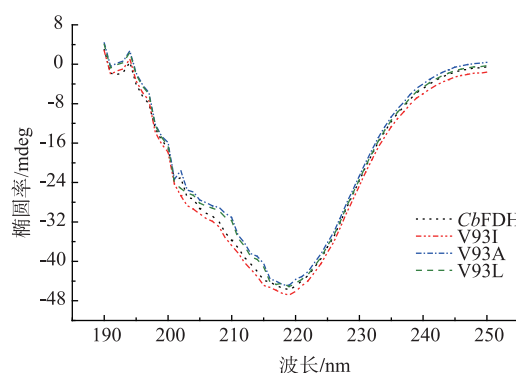


图8 突变体酶和野生型酶的圆二色谱分析

Fig. 8 Circular dichroism (CD) analysis of wild-type enzyme and its variants

2.5 突变体酶动力学参数分析

甲酸脱氢酶及其突变体酶的米氏动力学参数测定,结果见表3。突变体酶 V93A 和 V93I 对 NAD^+ 的 K_m 值相比野生型基本没有发生变化,而突变体酶 V93L 对 NAD^+ 的 K_m 值则比野生型高 3 倍左右,说明 V93L 对底物 NAD^+ 的亲合力明显下降。而对于

甲酸的 K_m 值,突变体酶 V93I 和 V93L 变化不大,而突变体酶 V93A 却比野生型高 8 倍左右,说明其对底物甲酸的亲和力明显下降。相比之下,突变体酶 V93I 对 NAD^+ 的催化效率是野生型酶的 2.33 倍 (即提高了 133%), 说明突变体酶 V93I 相比野生型和其他突变体更加具有优势。

表 3 突变体酶和野生型酶的动力学参数

Table 3 Kinetics analysis of the wild-type enzyme and its variants

突变体	$K_m(NAD^+)/$ ($\mu\text{mol/L}$)	$K_m(\text{甲酸})/$ ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat}/s^{-1}	$(k_{cat}/K_m)NAD^+/$ ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})$)
CbFDH	53.6 ± 3.4	7.3 ± 0.6	3.3 ± 0.3	0.06 ± 0.0067
V93I	60.2 ± 3.6	6.1 ± 0.5	8.49 ± 0.5	0.14 ± 0.0081
V93A	52.9 ± 2.3	58.2 ± 3.5	1.6 ± 0.2	0.03 ± 0.0013
V93L	182.1 ± 3.8	9.8 ± 0.7	2.3 ± 0.1	0.01 ± 0.0004

2.6 突变体酶三维结构分析

根据 CbFDH 的三维结构(PDB:5dn9), 利用软件将其对应的 V93 进行突变, 获得相关突变体酶的三维模型, 然后对这些模型的突变位点进行分析, 由于突变的氨基酸残基侧链变化的是甲基基团的增减, 经分析后发现突变没有引起相关氢键和离子键的变化。酶活测定表明, 突变体酶的酶活随着第 93 位氨基酸残基疏水性的增强而提高, 而突变体酶 V93L 的活性反而下降。由图 9(c) 可以看出, 突变体酶 V93L 的第 93 位 Leu 的 γ -碳原子上的两个甲基基团空间位阻过大, 阻碍了 NAD^+ 的结合, 进而造成该突变体酶对 NAD^+ 的亲和力明显下降, 从而也导致酶活下降。而对于突变体酶 V93A(图 9(d)), 由于第 93 位氨基酸侧链甲基的减少, 使得反应中的疏水保护下降, 可能影响了反应中心的氢质子转移, 从而导致对甲酸的亲和力下降, 进一步酶活也随之降低。对于正向突变体酶 V93I, 如图 9(b) 所示, 可以看出其第 93 位氨基酸的 γ -碳原子相比野生型酶(图 9(a))多了一个甲基基团, 该基团位于这个位置不仅使得底物通道入口的连接更加坚固, 同时也进一步加强了反应中心的疏水性, 这可能是该酶催化效率和酶活提高的主要原因。

结合酶学性质中的最适 pH、最适温度以及稳定性研究表明, 第 93 位氨基酸的变化主要是影响到酶对底物 NAD^+ 的结合能力和酶反应中心疏水环境的强弱, 从而使得酶活和相应动力学参数发生改变, 而对其他性质影响不大。

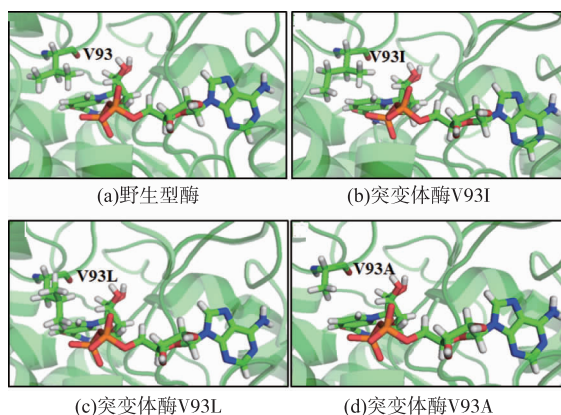


图 9 突变体酶及野生型酶三维结构分析

Fig. 9 Three-dimensional structure analysis of wild-type enzyme and its variants

2.7 突变体酶用于 L-正缬氨酸的不对称合成

由于突变体酶 V93I 的酶活和催化效率都比野生型 CbFDH 高, 因此为了进一步探索突变体酶 V93I 在应用上是否也比野生型 CbFDH 更有优势, 我们利用不对称还原 2-氧代戊酸合成 L-正缬氨酸体系来进行验证, 结果见图 10。在突变体酶 V93I 作为辅酶的情况下 (其他条件都一样), 浓度为 20 mmol/L 的底物 2-氧代戊酸完全转化时间由原来野生型酶的 2 h 缩短到了 1.5 h, 说明突变体酶 V93I 在辅酶 $NADH$ 再生方面的能力确实比野生型酶 CbFDH 强, 有待进一步挖掘使用。

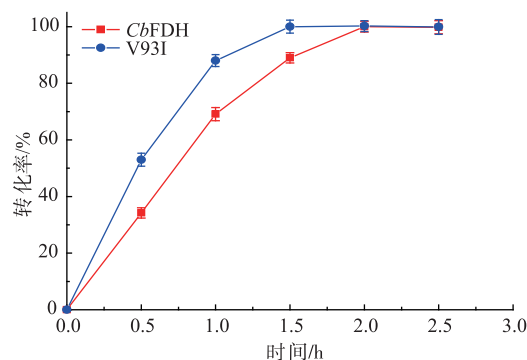


图 10 突变体酶 V93I 和野生型酶作为辅酶再生酶用于 L-正缬氨酸的不对称合成

Fig. 10 Asymmetric synthesis of L-norvaline using mutant enzyme V93I and wild-type enzyme for $NADH$ regeneration

3 结 语

作者通过定点突变对野生型酶 CbFDH 底物通道入口的氨基酸残基位点(V93 位点)的疏水性进行

改造, 获得的最佳突变体酶 V93I 的比酶活提高 22.6%、催化效率(NAD⁺)提高了 133%。在应用于 L-正缬氨酸不对称合成的转化体系中, 相比野生型酶

CbFDH, 同等条件下的突变体酶 V93I 能够提高体系的转化效率、缩短底物完全转化的时间, 具有较强的开发和应用潜力。

参考文献:

- [1] TISHKOV V I, POPOV V O. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase[J]. **Biochemistry**, 2004, 69(11): 1252-1267.
- [2] TISHKOV V I, POPOV V O. Protein engineering of formate dehydrogenase[J]. **Biomolecular Engineering**, 2006, 23(2): 89-110.
- [3] POPOV V O, LAMZIN V S. NAD(+)-dependent formate dehydrogenase[J]. **Biochemical Journal**, 1994, 301(3): 625-643.
- [4] SCHIOTT B, YAJUN ZHENG A, BRUICE T C. Theoretical investigation of the hydride transfer from formate to NAD⁺ and the implications for the catalytic mechanism of formate dehydrogenase[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 1998, 120(29): 7192-7200.
- [5] SCHIRWITZ K, SCHMIDT A, LAMZIN V S. High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*[J]. **Protein Science**, 2007, 16(6): 1146-1156.
- [6] FILIPPOVA E V, POLYAKOV K M, TIKHONOVA T V, et al. Crystal structures of complexes of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 101 with formate[J]. **Crystallography Reports**, 2006, 51(4): 627-631.
- [7] GUO Q, GAKHAR L, WICKERSHAM K, et al. Structural and kinetic studies of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*[J]. **Biochemistry**, 2016, 55(19): 2760-2771.
- [8] DONG G, RYDE U. Reaction mechanism of formate dehydrogenase studied by computational methods[J]. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 2018, 19(2): 55-67.
- [9] ALEKSEEVA A A, SERENKO A A, KARGOV I S, et al. Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations[J]. **Protein Engineering Design & Selection**, 2012, 25(11): 781-788.
- [10] OZGUN G P, ORDU E B, TUTUNCU H E, et al. Site saturation mutagenesis applications on *Candida methylolica* formate dehydrogenase[J]. **Scientifica**, 2016, 16: 4902450.
- [11] JIANG W, LIN P, YANG R, et al. Identification of catalysis, substrate, and coenzyme binding sites and improvement catalytic efficiency of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2016, 100(19): 8425-8437.
- [12] ALEKSEEVA A A, FEDORCHUK V V, ZARUBINA S A, et al. The role of Ala198 in the stability and coenzyme specificity of bacterial formate dehydrogenases[J]. **Acta Naturae**, 2015, 7(1): 60-69.
- [13] ZHENG J X, YANG T W, ZHOU J P, et al. Elimination of a free cysteine by creation of a disulfide bond increases the activity and stability of *Candida boidinii* formate dehydrogenase[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 2017, 83(2): e02624-16.
- [14] ORDU E B, SESSIONS R B, CLARKE A R, et al. Effect of surface electrostatic interactions on the stability and folding of formate dehydrogenase from *Candida methylolica*[J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2013, 95(11): 23-28.
- [15] TISHKOV V I, GALKIN A G, MARCHENKO G N, et al. Catalytic properties and stability of a *Pseudomonas* sp.101 formate dehydrogenase mutants containing Cys-255-Ser and Cys-255-Met replacements[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1993, 192(2): 976-981.
- [16] BOMMARIUS A S, KARAU A. Deactivation of formate dehydrogenase (FDH) in solution and at gas-liquid interfaces[J]. **Biotechnology Progress**, 2010, 21(6): 1663-1672.
- [17] BOMMARIUS A S, SCHWARM M, STINGL K, et al. Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine[J]. **Cheminform**, 1995, 6(12): 2851-2888.
- [18] ZHANG Chong, XING Xinhui. Research progress in cofactor regeneration systems[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2004, 20(6): 811-816. (in Chinese)
- [19] ZHANG Xian, LONG Shuiqing, RAO Zhiming, et al. Improving the activity and stability of L-asparaginase from *Bacillus subtilis*

- by site-directed mutagenesis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(11): 1128-1134. (in Chinese)
- [20] SLUSARCZYK H, FELBER S, KULA M R, et al. Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues[J]. **European Journal of Biochemistry**, 2000, 267(5): 1280-1289.
- [21] QI Y L, YANG T W, ZHOU J P, et al. Development of a multi-enzymatic desymmetrization and its application for the biosynthesis of L-norvaline from DL-norvaline[J]. **Process Biochemistry**, 2017, 55: 104-109.

会 议 消 息

会议名称: 2019 年第九届环境与生物科学国际会议(ICEBS 2019)

会议时间: 2019-09-25 至 2019-09-27

会议地点: 泰国曼谷

主办单位: ICEBS 2019

联系人: 蔺女士

电话: +86-28-86528465

Email: icebs@cbees.org

官方网址: <http://www.icebs.org/>

会议亮点: ICEBS 2019 被接收的文章会被发表在 IJBBB 期刊上并被 Engineering & Technology Digital Library, and indexed by WorldCat, Google Scholar, Cross ref, ProQuest 等知名数据库检索, 或者是发表在国际期刊 IJESD 上并被 Engineering & Technology Digital Library, and indexed by WorldCat, Google Scholar, Cross ref, ProQuest, CABI 等数据库检索。来自韩国的两位顶级教授受邀参加会议并将为会议呈现学术前沿的大会报告和研究成果, 他是来自韩国仁川国立大学的 Chan Jin Park 教授以及来自国立江陵原州大学的教授 Hyo Choi。2019 年 9 月 27 日在泰国曼谷将进行为期一日的观光。