

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(5):637–642; 4 May 2011  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 短链壬基酚聚氧乙烯醚脱氢酶脱氢催化机理

张蕊媛, 杨竟, 周广峰, 张娜, 乔广浩, 刘欣\*

辽宁师范大学城市与环境学院, 大连 116029

**摘要:**【目的】为研究短链壬基酚聚氧乙烯醚脱氢酶(sNPEO-DH)的脱氢氧化机制(基因克隆于 *Ensifer* sp. AS08),我们进行了以下实验。【方法】采用同源序列比对及同源建模的方法筛选出与其辅酶黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)异咯嗪基邻近的4个氨基酸残基。以定点突变方法分别构建了突变体,并进行了重组蛋白的表达纯化和酶活力测定。【结果】野生型和突变体的酶学动力学实验表明,突变体 N90A 和 N509A 对亲水性底物聚乙二醇(PEG1000)的相对活性分别降低为51%和89%,对疏水性底物 sNPEO 的活性分别降低为26%和40%,说明氨基酸残基 N90 和 N509 可能与底物的结合相关。突变体 H465A 的相对活性丧失了90%以上,突变体 N507A 完全丧失活性;瞬时“停-流”检测实验进一步证明 N507A 突变体阻断了底物向 FAD 传递质子的过程,突变体 H465A 阻断了 FAD 还原形成的 FADH<sub>2</sub> 脱氢再生的过程。【结论】以上结果说明 N507 和 H465 为 sNPEO 脱氢酶活性中心中参与对底物氧化脱氢及 FADH<sub>2</sub> 脱氢再生进行下一次反应的催化位点。

**关键词:** 短链壬基酚聚氧乙烯醚脱氢酶, 催化位点, 剑菌

**中图分类号:** Q814      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0637-06

壬基酚聚氧乙烯醚(NPEOs)为广泛使用的非离子表面活性剂,在环境中作为污染物经常被检测到<sup>[1]</sup>。在有氧条件下 NPEOs 被降解为乙氧基数目平均为2的代谢产物短链壬基酚聚氧乙烯醚(sNPEO)<sup>[2]</sup>,这些难降解的代谢产物一般在厌氧条件下缓慢降解产生出壬基酚(NP)<sup>[3]</sup>。壬基酚及 sNPEO 近年来被证明具有内分泌干扰作用,对人类健康具有潜在危害<sup>[4–5]</sup>。我们通过驯化培养分离出一株 sNPEO 好氧降解菌(*Ensifer* sp. AS08)<sup>[6]</sup>,并克隆、表达和鉴定出短链壬基酚聚氧乙烯醚脱氢酶(sNPEO-DH)。该酶由553个氨基酸组成(GenBank 登录号为 DQ368396),存在 ADP 结合模体以及 GMC(glucose-methanol-choline)氧化还原酶家族特征模体,结合等摩尔数的黄素腺嘌呤二核苷酸

(FAD)为其递氢体辅酶,催化短链壬基酚聚氧乙烯醚乙氧基的羟基脱氢氧化过程<sup>[7]</sup>。

为深入了解 sNPEO-DH 的脱氢催化分子机制,在本文中我们对该酶的活性中心运用生物信息分析方法进行了预测,并对筛选出的潜在催化位点进行了定点突变并构建了突变体重组基因进行原核表达、蛋白纯化和酶学动力学检验,最后利用瞬时“停止-流动”分光光度法检测了各个催化位点的电子流动方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

壬基酚聚氧乙烯醚(NPEO<sub>av10</sub>,乙氧基数平均为

**基金项目:**国家自然科学基金(30970342);国家教育部留学归国人员基金资助项目

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-411-82156511;E-mail: liuxin@lnnu.edu.cn

**作者简介:**张蕊媛(1985–),女,硕士研究生,研究方向为环境微生物。E-mail: zhangruiyuan5337@163.com

**收稿日期:**2010-10-17;**修回日期:**2011-01-04

10)和聚乙二醇 1000(PEG1000)购自国药集团化学试剂有限公司。限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、表达载体 pCold、PCR 引物合成及核酸测序均为宝生物工程(大连)有限公司的产品或服务(表 1)。

其他试剂均为分析纯及以上纯度级别。PCR 仪购自宝生物工程(大连)有限公司;UV-1800 紫外分光光度计购自上海美谱达仪器实验有限公司;UV-3000 分光光度计购自日本岛津制作所。

表 1 所用质粒的性质及来源

Table 1 Characteristics and sources of plasmids used in this study		
Plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or refs
pCold I DNA	4407 bp; Amp <sup>r</sup> ; His. Tag; TEE; <i>cspA</i> Promotor	TaKaRa bio
pCold- <i>npeA</i>	1659 bp complete ORF of NPEO-DH ligated with pCold vector	[7]
pCold- <i>npeA</i> -N90A	Amp <sup>r</sup> ; His. Tag <i>npeA</i> mutant N90A (AAT(GCT) N90A-F1 5' CATCAATCGCTTCGATGATCGCGAT 3' N90A-R1 5' ATCATCGAAGCGATTGATGACGACC 3'	This study
pCold- <i>npeA</i> -H465A	Amp <sup>r</sup> ; His. Tag <i>npeA</i> mutant H465A (CAT(GCT) H465A-F1 5' CGGTATATGCTCCCGTTGGGACCTG 3' H465A-R1 5' ATCATCGAAGCGATTGATGACGACC 3'	This study
pCold- <i>npeA</i> -N507A	Amp <sup>r</sup> ; His. Tag <i>npeA</i> mutant N507A (AAT(GCT) N507A-F1 5' TAAGCGGCGCTACAAACCTGCCCAT 3' N507A-R1 5' AGGTTTGTAGCGCCGCTTAGAAGCG 3'	This study
pCold- <i>npeA</i> -N509A	Amp <sup>r</sup> ; His. Tag <i>npeA</i> mutant N509A (AAC(GCT) N509A-F1 5' GCAATACAGCTCTGCCCATTTATGGC 3' N509A-R1 5' ATGGGCAGAGCTGTATTGCCGCTTA 3'	This study
pCold- <i>npeA</i> -H465A-N509A	Amp <sup>r</sup> ; His. Tag <i>npeA</i> double mutant H465A (CAT(GCT) and N507A (AAT(GCT)	This study

1.2 蛋白质 3 维结构同源建模

在 GMC 氧化还原酶家族中,葡萄糖氧化酶(GOX)的晶体结构已被解析并常用作该家族蛋白建模的模板<sup>[8-9]</sup>。我们运用 PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 工具对 sNPEO-DH 和来源于曲霉菌(*A. niger*)的 GOX(PDB 蛋白数据库的编号为 1cf3)进行了同源比对,二者在氨基酸序列上有 25% 的一致性。我们运用建模工具软件 MODELLER 9.1<sup>[10]</sup>以 1cf3 为模板构建了 sNPEO-DH 的 3 维模型。由于该软件没有针对 FAD 的能量参数,我们采用与模板结构相顺应的约束条件用锁定残基选项将 FAD 分子构建到 sNPEO-DH 模型中。

1.3 突变体的构建

我们选择四个 sNPEO-DH 中毗邻 FAD 异咯嗪环的氨基酸残基(N90、H465、N507 和 N509)分别进行了以丙氨酸(R 基团为脂肪族非极性,不参与电子传递)为取代物的定点突变。以亚克隆有野生型 sNPEO-DH 基因的 pCold-*npeA* 载体作为突变模板,按照表 1 所设计的引物分别进行常规 PCR 反应,PCR 产物进行琼脂糖电泳后割胶回收,再转化于 *E. coli* DH5  $\alpha$  感受态细胞中,37℃ 下 YT 培养基(1.6% 蛋白胨,1.0% 酵母粉和 0.5% NaCl)中培养过夜,提取质粒进行测序验证。

1.4 突变体蛋白的表达与纯化

经验证的各突变质粒再分别转化到 *E. coli* BL21 中,16℃ 下 LB 培养基中(添加 50  $\mu$ g/mL 氨苄)以 0.5 mmol/L IPTG 进行诱导表达,对 sNPEO-DH 的突变体的表达产物利用组氨酸亲和层析进行纯化,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS -PAGE)后电转移到 PVDF 膜上,使用以前制备的 sNPEO-DH 的多克隆抗体进行免疫印迹验证<sup>[7]</sup>。使用碧云天 BCA (Bicinchoninic acid)蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

1.5 酶学动力学分析

野生型和突变体 sNPEO-DH 的活性以美谱达 UV-1800 紫外分光光度计在 25℃ 下 600 nm 波长处对 2,6-二氯吡啶酚钠(DCIP;  $\epsilon$  = 19000)的还原量为指标进行测定<sup>[7]</sup>,PEG1000 和 NPEO<sub>av10</sub> 用做底物。1 个单位的酶活定义为野生型 sNPEO-DH 每分钟催化 1  $\mu$ mol 电子受体 DCIP 还原所需的酶量。比活定义为每毫克蛋白中所含有的酶活单位数。通过 Lineweaver-Burk 方程作图,得到米氏常数  $K_m$  值。所有数据均为 3 次独立实验的平均值。

1.6 瞬时“停止-流动”分光光度法检测

运用瞬时“停止-流动”分光光度法分析催化位点的电子和质子流动,简述如下。所用仪器为配备

快速混合附件(RMA -1A)的日本岛津 UV-3000 分光光度计,吸光度的精度为 0.0001。在 25℃ 条件下,快速混合后上样(混合附件 2 个孔中分别预装酶溶液以及底物或 DCIP 溶液),450 nm 波长处测定 FAD 的光吸收变化情况,记录时间为 300 ms,石英比色皿光径为 10 mm。测量 FAD 的还原反应时,一个孔内加入纯化后的酶,另一个孔中加入溶于 0.1 mol/L Tris -HCl (pH 8.0) 中的 10 mmol/L 的 PEG1000(由于没有外部的电子受体 DCIP,反应只能进行一步,不能持续进行)。测量 FADH<sub>2</sub> 重新氧化时,一个孔内加入溶于 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) 中的 0.01 mmol/L 的 DCIP,另一个孔中加入还原形式的酶。还原形式的酶制备方法如下,纯化后的酶与 PEG1000(反应缓冲液为 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl)在 10℃ 下共孵育 30 - 60 min,然后用 Amicon Ultra-15 离心式过滤器(Millipore 公司)富集蛋白充分去除底物,由于底物被去除,反应也只能进行一步。所有数据均为 3 次独立实验的平均值。

2 结果

2.1 sNPEO-DH 的三维建模及突变体构建

sNPEO-DH 与 GOX 的氨基酸序列同源性尽管不是很高,但它们在序列全长上几乎均能找到保守的结构域,包括 ADP 的结合模体、2 个 GMC 氧化还原酶家族的特征模体和 3 个 FAD 结合模体序列。运用 MODELLER 软件我们成功构建了 sNPEO-DH 的 3 维模型,在 FAD 异咯嗪环附近筛选了 4 个氨基酸残基(N90、H465、N507 和 N 509)作为潜在的催

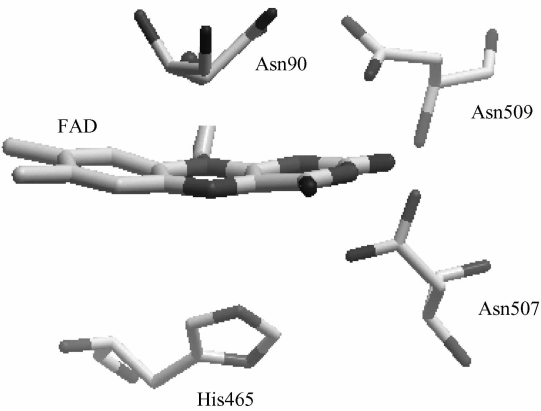


图 1 sNPEO-DH 活性中心的氨基酸残基

Fig.1 Amino acid residues in the active site of sNPEO-DH.

化位点(图 1)。运用定点突变方法分别构建了 5 个突变体(N90A、H465A、N507A、N509A 和 H465A-N507 A)。突变体成功在大肠杆菌中表达,并用组氨酸亲和和层析进行了纯化。免疫印迹分析结果显示突变蛋白的分子量与野生型 sNPEO-DH 是相同的(图 2),显示突变没有导致蛋白质高级结构的改变。

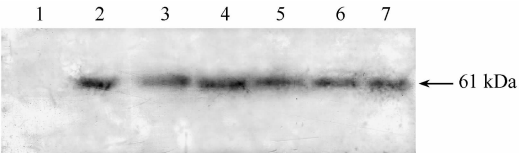


图 2 野生型和突变体 sNPEO-DH 的免疫印迹检测

Fig.2 Western blotting analysis of wild and mutant sNPEO-DHs. Western blotting analysis was carried out as described in Materials and Methods. Lane 1, cell free extract of *E. coli* BL21 harboring pCold-*npeA* before induction by IPTG (4.8 μg); Lane 2, cell free extract of *E. coli* BL21 harboring pCold-*npeA* after induction by IPTG (6.0 μg); lane 3 to lane7, cell free extracts of *E. coli* BL21 harboring pCold-*npeA* mutants after induction by IPTG (from left to right: N90A (5.0 μg), H465A (5.4 μg), N507A (5.2 μg), N509A (5.1 μg) and H465A-N507A double mutant (5.0 μg)).

2.2 突变体的酶学动力学检测

野生型和突变体的酶学动力学检测结果见表 2。由于 sNPEO 的各组分为疏水性物质,按梯度稀释后的浓度准确性无法保证,而以前的实验显示 sNPEO-DH 对 PEG1000 和 NPEO<sub>av10</sub> 都具有一定的活性<sup>[7]</sup>,因此我们采用后二者作为底物开展了酶活性检测。结果显示突变体 N507A 和 H465A -N507A 完全失去活性。突变体 H465A 的 *k<sub>m</sub>* 值与野生型的相比没有太大差异,说明其对底物的亲和力没有显著变化,但对两种底物的 *k<sub>cat</sub>* 值明显比野生型分别下降了约 95% 和 89%,且相对活性均降低到 10% 以下。上述结果表明,N507 是 sNPEO-DH 的一个关键催化位点,H465 为与催化作用密切相关的位点。突变体 N90A 和 N509A 的 *k<sub>m</sub>* 和 *k<sub>cat</sub>* 值与野生型相比有小幅降低,这表明他们不起催化的作用,对底物 NPEO<sub>av10</sub> 的相对活性比对 PEG1000 的要低 50% 左右,说明这些氨基酸残基可能与含疏水集团底物的结合相关。

2.3 sNPEO-DH 催化底物脱氢氧化机理

为确认筛选的氨基酸残基在脱氢反应中的作用,我们采用瞬时“停止-流动”分光光度法实验,通过监控(0 - 300 ms) FAD 在 450 nm 处的吸收变化,

表 2 纯化后的野生型和突变体 sNPEO-DH 酶学动力学特性

Table 2 Kinetic properties of the purified wild type and mutant NPEO-DHs

Mutant	Substrates	$V_{\max}$ (units/mg)	$K_m$ (mmol)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \text{ mmol}^{-1}$ )	Relative activity (%)
wild type	PEG 1000	$3.9 \pm 0.5$	$3.3 \pm 0.3$	$12 \pm 0.9$	$3.6 \pm 0.3$	$100 \pm 2.8$
	NPEO <sub>av10</sub>	$3.6 \pm 0.7$	$2.1 \pm 0.4$	$11 \pm 1.5$	$5.2 \pm 0.4$	$100 \pm 4.2$
N90A	PEG 1000	$2.8 \pm 0.2$	$4.5 \pm 0.3$	$8.4 \pm 1.0$	$1.9 \pm 0.3$	$51 \pm 1.6$
	NPEO <sub>av10</sub>	$1.8 \pm 0.4$	$4.1 \pm 0.5$	$5.5 \pm 0.8$	$1.3 \pm 0.2$	$26 \pm 1.0$
H465A	PEG 1000	$0.2 \pm 0.05$	$2.5 \pm 0.2$	$0.6 \pm 0.1$	$0.24 \pm 0.1$	$6.6 \pm 0.3$
	NPEO <sub>av10</sub>	$0.43 \pm 0.1$	$2.4 \pm 0.6$	$1.3 \pm 0.3$	$0.54 \pm 0.1$	$10 \pm 0.4$
N507A	PEG 1000	n. a. *	—	—	—	—
	NPEO <sub>av10</sub>	—	—	—	—	—
N509A	PEG 1000	$1.6 \pm 0.1$	$2.8 \pm 0.4$	$9.1 \pm 0.5$	$3.3 \pm 0.1$	$89 \pm 0.9$
	NPEO <sub>av10</sub>	$1.2 \pm 0.3$	$1.7 \pm 0.4$	$3.6 \pm 0.5$	$2.1 \pm 0.1$	$40 \pm 0.8$
H465A-N507A	PEG 1000	n. a.	—	—	—	—
	NPEO <sub>av10</sub>	—	—	—	—	—

\* n. a. ; no activity. The results are represented as mean values  $\pm$  SD from three independent measurements.

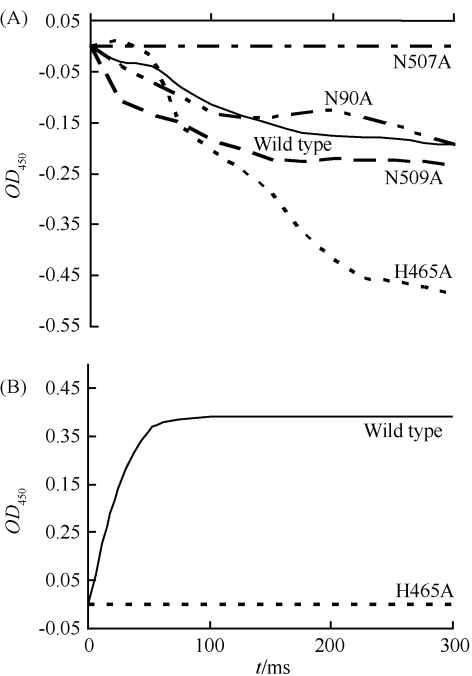


图 3 野生型和突变体 sNPEO-DH 的瞬时“停止-流动”分光光度法检测

Fig.3 Transient kinetic traces observed with stopped-flow apparatus in the reactions of wild type and mutant sNPEO-DHs with substrate or electron acceptor. A, Reduction of FAD by wild type and mutant sNPEO-DHs with PEG 1000. The reaction was monitored 300ms by the reduction of FAD at 450 nm; B, Re-oxidation of FAD by reduced wild type and mutant sNPEO-DHs with DCIP. The reaction was monitored by the reproduction of FAD from FADH<sub>2</sub> at 450 nm.

对野生型和突变体酶在酶初始反应过程上进行了比较。图 3-A 显示,野生型酶,突变体 N90A、N509A 和 H465A 均检测到 FAD 的光吸收递减;与此相反,突变体 N507A 没有使反应体系中的 FAD 有任何减

少,这表明质子从底物转移到 FAD 是由 N507 而不是由 N90、N509 和 H465A 介导的。为了探讨在催化过程中 H465 的作用,我们采用还原形式的酶(野生型和 H465A 突变体)与低浓度电子受体 DCIP 混合后检测了 FADH<sub>2</sub> 的氧化再生情况(图 3-B)。野生型的 sNPEO-DH 能够检测到 FAD 吸光度的增加,说明发生了 FADH<sub>2</sub> 氧化为 FAD 的再生反应;而 H465A 突变体丧失 FADH<sub>2</sub> 再氧化能力,说明 H465 参与了调解 FADH<sub>2</sub> 转移质子和电子至电子受体的氧化再生过程。

3 讨论

GMC 氧化还原酶家族的概念最早由 Cavener 提出,酶的代表包括来自黑曲霉的 GOX、果蝇的葡萄糖脱氢酶、多形汉逊酵母的甲醇氧化酶和大肠杆菌的胆碱脱氢酶,该家族成员在原核和真核生物中广泛存在<sup>[11]</sup>。虽然这个家族的蛋白质序列相似性不高,催化的反应多种多样,但该家族成员都具有保守的 ADP 结合模体(N-末端约 30 个氨基酸的保守序列片断)和该家族标签模体 1 和 2 的一致序列等<sup>[11]</sup>。此外,该家族成员蛋白质 3 维结构的解析结果显示,它们的蛋白序列上还有 3 个与 FAD 相结合的模体和 2 个保守的氨基酸残基(可能的催化位点)<sup>[12]</sup>。

GMC 氧化还原酶家族成员均以 FAD 为辅酶,FAD 的异咯嗪环是参与氧化还原的重要基团。以 D-和 L-氨基酸氧化酶为例,FAD 的异咯嗪环上 1 和 5 位的氮之间的共轭双键可加氢脱氢,起递氢体作

用<sup>[13]</sup>。在 GOX 中,FAD 的还原产物 FADH<sub>2</sub> 是一种有效的还原剂,非常容易和分子氧发生反应而再氧化形成 FAD<sup>[14]</sup>。黑曲霉菌 GOX 的催化机制研究显示, $\beta$ -D-葡萄糖脱 2 个氢被氧化成  $\delta$ -葡萄糖内酯,其辅酶 FAD 还原成 FADH<sub>2</sub>;H559 作为催化位点催化  $\beta$ -D-葡萄糖脱氢并转移给 FAD 形成 FADH<sub>2</sub><sup>[15-16]</sup>。在 FADH<sub>2</sub> 氧化再生 FAD 的反应中,其 2 个质子和 2 个电子通过 GOX 的 H516 调节下传递给分子氧,产生过氧化氢<sup>[17]</sup>。

对这个家族的脱氢酶系成员的催化机制近几年也有报道,太田等发现,*Sphingopyxis terrae* 的聚乙烯乙二醇脱氢酶(PEG-DH)的 H467 和 N511(对应于黑曲霉 GOX 的 H516 和 H559)是与催化活性密切相关的位点,但具体的催化机制没有说明<sup>[18]</sup>。本文的结果首次证明,在脱氢酶系的 sNPEO-DH 中 N507 为底物脱氢催化位点,而 H465 为辅酶 FADH<sub>2</sub> 氧化再生的调节位点。通过与氧化酶系的 GOX 比较我们可以看出,脱氢酶系的催化位点为天冬酰胺(PEG-DH 的 N511 和 sNPEO-DH 的 N507)而不是组氨酸(GOX 中的 H559),说明这两种酶系在所作用底物的选择压力下有不同的进化方向。尽管催化位点氨基酸残基有所不同,但该家族的氧化酶和脱氢酶成员均以内源结合的 FAD 为辅基,因此在催化机理上均显示为二元的“乒-乓”反应机制<sup>[19]</sup>。

## 参考文献

- [1] Jonkers N, Knepper TP, de Voogt P. Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(2): 335-340.
- [2] Kvestak R, Ahel M. Occurrence of toxic metabolites from nonionic surfactants in the Krka River estuary. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 1994, 28(1): 25-34.
- [3] Giger W, Brunner PH, Schaffner C. 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*, 1984, 225(4662): 623-625.
- [4] Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, 1991, 92: 167-173.
- [5] Jobling R, Sumpter JP. Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 1993, 27(3-4): 361-372.
- [6] Liu X, Tani A, Kimbara K, Kawai F. Metabolic pathway of xenoestrogenic short ethoxy chain-nonylphenol to nonylphenol by aerobic bacteria, *Ensifer* sp. strain AS08 and *Pseudomonas* sp. strain AS90. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(3): 552-559.
- [7] Liu X, Tani A, Kimbara K, Kawai F. Xenoestrogenic short ethoxy chain nonylphenol is oxidized by a flavoprotein alcohol dehydrogenase from *Ensifer* sp. strain AS08. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(6): 1414-1422.
- [8] Kiess M, Hecht HJ, Kalisz HM. Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*: primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 252(1): 90-99.
- [9] Witt S, Wohlfahrt G, Schomburg D, Hecht HJ, Kalisz HM. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of D-glucose. *Biochemical Journal*, 2000, 347(2): 553-559.
- [10] Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 234(3): 779-815.
- [11] Cavener DR. GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 223(3): 811-814.
- [12] Zámocký M, Hallberg M, Ludwig R, Divné C, Haltrich D. Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenase reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. *Gene*, 2004, 338(1): 1-14.
- [13] Massey V, Curti B, Muller F, Mayhew SG. On the reaction of borohydride with D- and L-amino acid oxidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1968, 243(6): 1329-30.
- [14] Fitzpatrick PF. Substrate dehydrogenation by flavoproteins. *Accounts of Chemical Research*, 2001, 34(4): 299-30.
- [15] Wohlfahrt G, Witt S, Hendle J, Schomburg D, Kalisz HM, Hecht HJ. 1.8 and 1.9-Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 1999, 55(5): 969-977.
- [16] Leskovac V, Trivic S, Wohlfahrt G, Kandrak J, Pericin

- D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37(4): 731-750.
- [17] Roth JP, Klinman JP. Catalysis of electron transfer during activation of O<sub>2</sub> by the flavoprotein glucose oxidase. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003, 100(1): 62-67.
- [18] Ohta T, Kawabata T, Nishikawa K, Tani A, Kimbara K, Kawai F. Analysis of amino acid residues involved in catalysis of polyethylene glycol dehydrogenase from *Sphingopyxis terrae*, using three-dimensional molecular modeling-based kinetic characterization of mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 4388-4396.
- [19] Gibson QH, Swoboda BEP, Massey V. Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239(11):3927-3934.

## Dehydrogenation by short ethoxy chain nonylphenol dehydrogenase from *Ensifer* sp. AS08

Ruiyuan Zhang, Jing Yang, Guangfeng Zhou, Na Zhang, Guanghao Qiao, Xin Liu \*

College of Urban and Environmental Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

**Abstract:** [Objective] To study dehydrogenation by short ethoxy chain nonylphenols dehydrogenase (sNPEO-DH) from *Ensifer* sp. AS08. [Methods] We screened four amino acid residues of sNPEO-DH that are adjacent to the isoalloxazine ring of the coenzyme flavin adenine dinucleotide (FAD) by using multiple sequence alignment and homology modeling. Mutations were introduced by site-directed mutagenesis. The recombinant proteins were expressed, purified and assayed. [Results] The relative activities of mutants N90A and N509A against the hydrophilic substrate PEG1000 decreased to 51% and 89%, respectively, and against the hydrophobic substrate NPEO<sub>av10</sub> decreased to 26% and 40%, respectively; indicating that N90 and N509 might be related to substrate binding. The relative activity of mutant H465A and N507A lost 90% and 100%, respectively; “stop-flow” experiments revealed that the processes of proton transfer from substrate to FAD and from FAD to enzyme were blocked in mutant N507A and H465A, respectively. [Conclusion] Amino acid residues N507 and H465 located at the activity center of sNPEO-DH and play roles as catalytic sites for the oxidative dehydrogenation of the substrates and FADH<sub>2</sub>, respectively.

**Keywords:** short ethoxy chain nonylphenol dehydrogenase, catalytic site, *Ensifer* sp. AS08

(本文责编:王晋芳)