

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

张波涛^{1,2}, 张荣珍^{1*}, 王磊¹, 徐岩^{1*}

¹江南大学生物工程学院, 教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122

²中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

摘要: 【目的】从芽胞杆菌 (*Bacillus* sp.) YX-1 基因组中克隆出一种有机溶剂耐受型的葡萄糖脱氢酶基因, 实现了该基因在大肠杆菌中的高效表达, 研究了重组蛋白的酶学性质。【方法】依据芽胞杆菌属中葡萄糖脱氢酶氨基酸序列的保守性, 设计合理引物, 钓取来源于 *Bacillus* sp. YX-1 的葡萄糖脱氢酶基因, 构建诱导型表达载体 pET28a-*gdh*, 于大肠杆菌中进行表达。镍柱亲和层析法纯化重组蛋白, 考察了重组蛋白的酶学性质。【结果】葡萄糖脱氢酶基因全长为 786 bp, 编码 261 个氨基酸。酶学研究结果表明: 该酶最适反应温度为 45℃, 最适 pH 值为 8.0; 具有良好的有机溶剂耐受性, 于 50% 的辛烷、环己烷、癸烷中室温放置 1 h 后, 酶活仍能保持 90% 以上; 具有较宽的底物谱, 对多种糖均具有一定的催化活性, 其中催化 D-葡萄糖的活力最高, 产生还原型辅酶因子; 对辅酶 NADH 和 NADPH 具有相似的依赖性, 对 NAD⁺ 和 NADP⁺ 的催化比活分别为 8.37 U/mg 和 8.62 U/mg。【结论】利用生物信息学成功地挖掘出 *Bacillus* sp. YX-1 一种耐有机溶剂的葡萄糖脱氢酶, 为氧化还原酶在有机相反应中的的辅酶再生循环提供了新型的生物催化剂。

关键词: 葡萄糖脱氢酶, 辅酶再生, 有机溶剂耐受性, 底物特异性

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)06-0561-08

氧化还原酶在催化反应时具有独特的区域、立体、化学选择性, 已广泛用于制备多种手性醇类物质^[1-4]。几乎所有的氧化还原反应都需要辅酶 NAD(P)H 的参与, 辅酶价格昂贵, 稳定性差、难以重复利用, 严重限制了氧化还原酶的工业化应用^[5-7]。在多种辅酶再生循环策略中, 酶偶联法具有共底物价廉、反应的热力学条件容易控制、辅酶再生效率高和循环稳定性好等优点, 因而已成为应用

最为广泛的辅酶再生技术^[8-10]。在目前最常用的酶偶联辅酶循环系统中, 葡萄糖脱氢酶是最佳的偶联酶之一。

葡萄糖脱氢酶 (GDH; EC 1.1.1.47) 是短链醇脱氢酶家族中的一员, NAD(P)⁺ 为氢受体时, 可特异性地催化氧化 β-D-葡萄糖, 生成葡萄糖酸 (D-葡萄糖酸-δ-内酯), 同时伴随着还原性辅酶 NAD(P)H 的生成。与甲酸脱氢酶 (FDH) 相比, 葡萄糖脱氢酶

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070059); 国家“973 项目” (2011CB710800); 国家“863 计划” (2007AA02Z226); 新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0498); 江南大学自主科研计划面上项目 (JUSRP21121)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: rzzhang666@yahoo.com.cn, biosean@yahoo.com.cn

作者简介: 张波涛 (1986-), 男, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和生物催化研究。E-mail: zhangbotao1986@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-02-02

对辅酶 NAD(P)⁺ 的比活更高, 具有更强的还原性辅酶 NAD(P)H 的再生能力, 既可以适用于 NADH 的再生, 又可适用于价格更昂贵的 NADPH 的再生^[11-12]。如将羧基还原酶与葡萄糖脱氢酶偶联制备(S)型 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯, 实现 NADPH 循环利用, 产物量高达 430 g/L^[13]。利用醇脱氢酶和葡萄糖脱氢酶双酶偶联反应不对称合成(S)-3,5-双三氟甲基苯乙醇, 不仅实现了还原性辅酶 NADH 的循环, 而且加快了反应的速率, 产物的时空得率高达 260 g/L/d^[14]。但迄今为止很少有文献报道能够耐受有机溶剂的葡萄糖脱氢酶的筛选, 以用于有机介质中的氧化还原反应^[15-17]。

本研究依据芽胞杆菌属中葡萄糖脱氢酶氨基酸的保守序列, 克隆了来源于芽胞杆菌(*Bacillus sp.*) YX-1 的葡萄糖脱氢酶基因, 实现了其在大肠杆菌(*Escherichia coli*) 的高效表达。酶学性质研究表明, 该葡萄糖脱氢酶的有机溶剂耐受性较好, 底物谱宽广, 对 NAD⁺ 与 NADP⁺ 具有相似的依赖性。该研究为解决有机溶剂中的氧化还原反应辅酶限制问题奠定了较好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物: 大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 购自 Invitrogen 公司, *Bacillus sp.* YX-1 菌株为实验室保藏。克隆质粒 pMD19-T、表达质粒 pET28(a) 购自 Invitrogen 公司。所需引物均由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)

表 1. 引物序列

Table 1. The sequences of primers

Primers	Sequence (5'→3')
gdh_1	TTYGGNACNCTNGAYRTNATGTA
gdh_2	CCNATRTANCCCATNGGNATCAT
gdh_3	GAATTC <u>CATATGTACACGGAT</u> (<i>Nde</i> 1)
gdh_4	ATCCTGAGCTCTTATCCGCGGC (<i>Sac</i> 1)

Y = C or T; N = A T C or G; R = A or G; the restriction endonuclease sites are underlined.

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 所用试剂、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、低分子质量标准蛋白购于大连宝生物有限公司; 质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; 细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技

(北京)有限公司; NAD⁺ 和 NADP⁺ 购自北京经科宏达生物技术有限公司; 酶标仪购自美国 Thermo 公司; 超声破碎仪 VCX750 购自美国 Sonic 公司; ÄKTA 蛋白纯化仪和镍离子亲和层析柱购自美国 GE 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 *Bacillus sp.* YX-1 基因组的提取

将 *Bacillus sp.* YX-1 按 2% 的接种量接种于含 50 mL LB 培养基的三角瓶中, 于 37°C、200 r/min 的摇床中震荡培养 16 h。菌体于 8000 × g 离心 10 min, 用生理盐水洗涤 2 次后收集细胞用于基因组的提取。基因组的提取按照细菌基因组提取试剂盒的操作步骤进行。

1.3 *Bacillus sp.* YX-1 葡萄糖脱氢酶保守序列的克隆

首先利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 检索到芽胞杆菌属内不同种的葡萄糖脱氢酶的氨基酸序列, 然后利用 DNAMAN 和 ESPrint 对上述氨基酸序列进行多序列比对, 得到了两段葡萄糖脱氢酶氨基酸的保守序列 (FGTLDV/MI 和 MIPMGYIG), 基于氨基酸的保守序列, 设计简并引物 gdh-1 和 gdh-2(表 1)。以 *Bacillus sp.* YX-1 基因组为模板, 利用简并引物 gdh-1 和 gdh-2 克隆 gdh 的保守序列。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 4 min; 95°C 变性 1 min, 45°C 退火 1 min, 72°C 延伸 30 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min, 冷却至 12°C, 结束反应, 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体通过 TA 互补连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选和菌落 PCR 验证, 获得重组质粒。重组质粒送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.4 *Bacillus sp.* YX-1 葡萄糖脱氢酶全基因的克隆及表达载体的构建

将 PCR 获得的葡萄糖脱氢酶基因保守序列输入 NCBI 中检索发现, 该段序列与来源于 *B. amyloliquefaciens* DSM7 的葡萄糖脱氢酶基因 (GenBank: NC-014551.1) 的同源性最高。再次设计引物 gdh-3 和 gdh-4, 以 *Bacillus sp.* YX-1 基因组为模板, 采用 PCR 的方法扩增葡萄糖脱氢酶基因全长, 纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选和双酶切验证, 获得重组质粒 T-gdh。利用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sac* I 分别对 T-gdh 和 pET28a 进行

酶切, 胶回收和纯化酶切产物, 在连接酶的作用下, 线性化的 pET28a 载体和葡萄糖脱氢酶基因片段于 16℃ 连接 12 h, 连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板抗性筛选, 菌落 PCR 验证, 获得阳性重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-gdh。重组质粒送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 重组蛋白的诱导表达

挑取阳性单菌落接种于 4 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37℃、200 r/min 振荡培养过夜。取 1 mL 培养液转接于 50 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37℃、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6 - 0.8 时, 向培养物中加至终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 于 17℃ 诱导培养 14 h, 4℃ 离心收集菌体。少部分菌体用于 SDS-PAGE 电泳检测目标蛋白的表达, 另外部分菌体经生理盐水洗涤 2 次后用于目标蛋白纯化。

1.6 重组蛋白的纯化

称取 10 g 湿菌体, 加入适量 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 悬浮细胞, 于冰浴中进行超声波细胞破碎 (工作 1 s, 间隔 3 s, 工作时间 5 min)。4℃ 条件下 12000 × g 离心 30 min 收集上清液作为粗酶液。利用镍离子亲和层析柱对粗酶液进行纯化, 纯酶液超滤脱盐后用于酶活力测定。

1.7 酶活力的测定

根据化学反应 $\beta\text{-D-葡萄糖} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{GDH}} \text{D-葡萄糖-}\delta\text{-内酯} + \text{NADPH}$, NADPH 的生成会引起 340 nm 处吸光值的升高, 因此可以通过测定反应过程中 340 nm 处的吸光值的变化, 来衡量葡萄糖脱氢酶的活力。酶活测定条件: 总反应体积 100 μL, 分别加入终浓度为 0.1 mol/L、2.0 mmol/L、0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0)、NADP⁺ 及 D-葡萄糖, 37℃ 保温 2 min, 加入适量纯酶液后开始扫描 340 nm 处吸光值的变化。蛋白质含量测定采用 Bradford 法, 以牛血清白蛋白 BSA 为标准品。酶活力定义为: 在上述条件下, 每分钟催化生成 1 μmol 的 NADPH 的酶量定义为一个酶活单位。

酶活的计算公式为: 酶活 (U) = $\text{EW} \times V \times 10^3 / (6220 \times 0.3)$

比活的计算公式: 比活 (U/mg) = 酶活 (U) / 蛋白量 (mg)

其中, EW: 1 min 内 340 nm 处吸光度的变化; V: 反应液的体积 (mL); 6220: NADPH 在 340 nm 下的摩尔消光系数 [L / (mol·cm)]; 0.3: 光程距离 (cm)。

1.8 最适反应温度与热稳定性

将除酶外的测定酶活混合物置于 20℃ - 75℃ 下保温 2 min 后加入酶液, 按照 1.7 酶活测定方法快速测定酶活力, 从而确定酶的最适反应温度。为了研究温度对酶稳定性的影响, 将酶液置于 20℃ - 60℃ 下保温 1 h 后, 按照 1.7 中的酶活测定方法测定残留酶活力, 于 4℃ 下保温 1 h 作为对照。

1.9 最适反应 pH 与 pH 稳定性

配制不同 pH 值 (pH 5.0 - 9.0) 的缓冲液和底物葡萄糖及辅酶 NADP⁺ 溶液, 按照 1.7 酶活测定方法, 测定纯酶在不同 pH 缓冲液中的酶活力以考察酶反应的最适 pH, 以最适反应 pH 缓冲液中的酶活力为 100%。所需不同 pH 缓冲液如下: 0.1 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.0 - 6.5); 0.1 mol/L 的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 6.0 - 8.0); 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5 - 9.0)。将酶分别放置在不同 pH 值的缓冲液中于 4℃ 保存 24 h, 按照 1.7 中酶活测定方法测定残留酶活力, 从而判断酶在不同 pH 值下的稳定性。

1.10 酶对辅酶的依赖性

根据 1.7 酶活测定方法, 分别以 2.0 mmol/L 的 NAD⁺ 和 NADP⁺ 为辅酶测定纯酶的酶活性。为了研究酶对不同辅酶的亲和力, 以 0.1 mol/L 的葡萄糖为底物, 分别测定不同辅酶 NAD(P)⁺ 浓度 (0.05 - 0.1 mmol/L) 下的酶活力, 然后计算出酶对不同辅酶的 K_m 值, K_{cat} 值及 K_{cat} / K_m 值。

1.11 酶的有机溶剂稳定性

取等量的纯酶, 按照 1:1 的比例分别添加不同有机溶剂 (异戊酸乙酯、丁酸乙酯、辛酸乙酯、仲辛醇、异丙醇、正戊醇、正丁醇、甲基叔丁基醚、丙酮、二甲亚砜、环己烷、辛烷、癸烷), 于 25℃、200 r/min 的摇床中震荡 1 h, 按照 1.7 酶活测定方法测定剩余酶活力, 从而测定葡萄糖脱氢酶对不同有机溶剂的耐受性, 以添加等量的 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 作为对照。

1.12 底物特异性

分别以等量的糖 (D-木糖、D-果糖、D-甘露糖、D-半乳糖、麦芽糖、蔗糖) 替代葡萄糖, 按照 1.7 酶活测定方法测定葡萄糖脱氢酶对不同底物的酶活

力。以酶催化葡萄糖的酶活力为 100%，其他数值与之相比即为酶对不同底物的相对活力。

2 结果

2.1 *Bacillus* sp. YX-1 葡萄糖脱氢酶基因的克隆与表达

以 *Bacillus* sp. YX-1 基因组为模版,利用简并引物 *gdh-1* 和 *gdh-2* 扩增获得 *gdh* 基因的保守序列,大小为 411 bp。将保守序列与 NCBI 数据库检索,发现其与来源于 *B. amyloliquefaciens* DSM7 的葡萄糖脱氢酶基因 (GenBank: NC-014551.1) 同源性为 90.1%,因而根据 *B. amyloliquefaciens* DSM7 的葡萄糖脱氢酶基因序列,再次设计引物 *gdh-3* 和 *gdh-4*,PCR 扩增得到 *gdh* 全长基因。纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体相连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆培养后提取质粒,*Nde* I 和 *Sac* I 酶切验证结果表明 *gdh* 已克隆于 pMD19-T 质粒中。*Nde* I 和 *Sac* I 酶切的 *gdh* 与 pET-28a 线性化片段经粘性末端连接,转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,经菌液 PCR 鉴定,获得阳性重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*gdh*。进一步的测序结果显示该基因全长 786 bp,编码 261 个氨基酸,翻译成多肽后的相对分子质量约为 28.5 kDa。

2.2 重组蛋白的诱导表达及其纯化

重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*gdh* 经 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 17 $^{\circ}$ C 诱导 14 h 后,SDS-PAGE 结果显示:与不含目的基因 *gdh* 的对照菌株 *E. coli* BL21/pET28a 相比较,葡萄糖脱氢酶在 *E. coli* BL21 中获得高效表达,分子量大小约为 30 kDa (图 1),比理论计算值 28.5 kDa 略偏大,这很可能是重组蛋白的 N 末端有一个 6 \times Histidine 标签。重组菌经超声破碎,高速离心获得粗酶液,粗酶液经镍离子亲和层析纯化,SDS-PAGE 结果显示为单一条带 (图 1),大小约 30 kDa,与重组葡萄糖脱氢酶大小相同,表明经过一步镍离子亲和层析纯化,可获得电泳纯的葡萄糖脱氢酶,用于后续的酶学性质研究。

2.3 酶的最适反应温度与热稳定性

温度对酶催化反应的活性具有重要的影响,一般情况下,随着温度的升高,活化分子数增多,酶促反应速率随之增加,然而过高的温度又会使酶失活,进而反应速率随之降低。研究结果 (图 2) 显示,

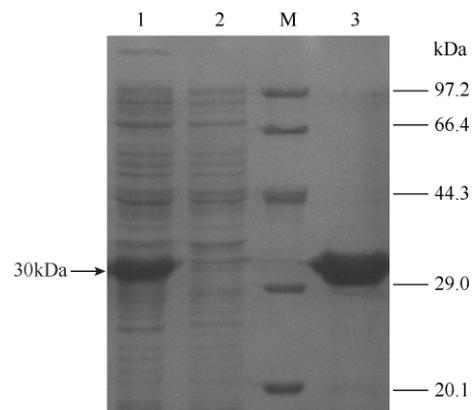


图 1. 葡萄糖脱氢酶在大肠杆菌中的表达及纯化

Figure 1. Expression of glucose dehydrogenase (GDH) in *E. coli* and its purification. Lane 1, Cell-free extracts of *E. coli* BL21/pET28a-*gdh* induced by 0.1 mmol/L IPTG; lane 2, Cell-free extracts of *E. coli* BL21/pET28a; M, Protein marker; lane 3, Purified GDH by Ni-affinity Chromatography.

GDH 的最适反应温度为 45 $^{\circ}$ C,在此温度下酶的比活达到最高的 11.19 U/mg,在温度低于 45 $^{\circ}$ C 时,酶活力随着温度的升高而增大,然而当温度高于 60 $^{\circ}$ C 时,酶活力急剧下降。酶的热稳定性研究结果 (图 2) 表明,GDH 对温度较敏感,在低于 30 $^{\circ}$ C 时酶的活力几乎不受影响,但是当温度高于 30 $^{\circ}$ C 时,酶的活性迅速下降,35 $^{\circ}$ C 下的残余酶活仅为 57%,当温度高于 60 $^{\circ}$ C,酶的催化活性几乎完全丧失。

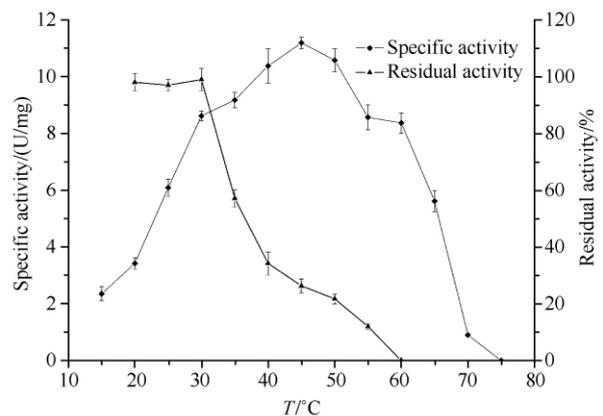


图 2. 温度对酶反应活性和稳定性的影响

Figure 2. Effects of temperature on the activity and stability of glucose dehydrogenase (GDH).

2.4 酶的最适反应 pH 与 pH 稳定性

酶的催化活性与环境的 pH 值有着密切的关系,反应体系的 pH 不仅会影响酶的活性必需基团的解离程度,还会影响酶的构型与稳定性。通常,酶

在一定的 pH 条件下才有活性, 高于或低于某一 pH 值, 酶便会失活。由图 3 可以看出, GDH 在 0.1 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 中表现出最大的催化活性, 在 pH 5.0–8.0 范围内时, 酶活力随着 pH 的增加而增加; 当 pH 值从 8.0 上升至 9.0 时, 酶活力下降。GDH 具有较广的 pH 稳定范围, 在 pH 6.0–9.0 内相对稳定, 酶活保持在 60% 以上。

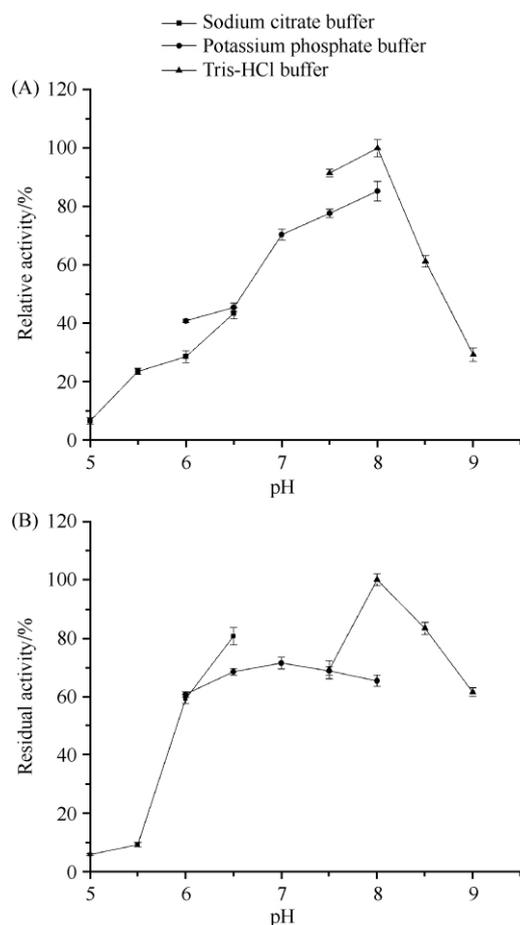


图 3. pH 对酶反应活性 (A) 和稳定性 (B) 的影响

Figure 3. Effects of pH on the activity (A) and stability (B) of glucose dehydrogenase (GDH).

表 2. 重组 GDH 对不同辅酶的动力学参数分析

Table 2. The kinetic analysis of the recombinant GDH for NADP⁺ and NAD⁺

Cofactors	Specific activities / (U/mg)	K_m / (mmol/L)	K_{cat} / (1/s)	$(K_{cat} / K_m) / [L / (s \cdot mmol)]$
NADP ⁺	8.62 ± 0.14	0.24 ± 0.01	125.23 ± 1.5	520.99 ± 12.78
NAD ⁺	8.37 ± 0.09	0.27 ± 0.01	124.19 ± 0.9	461.12 ± 1.94

列的保守性, 克隆出目的酶基因已成为挖掘新型蛋白的重要手段。本研究以芽胞杆菌属的葡萄糖脱氢酶氨基酸的保守序列出发, 从 *Bacillus* sp. YX-1 基因组中克隆了一种新型的葡萄糖脱氢酶基因, 并构

2.5 辅酶依赖性

利用双倒数作图法求得 GDH 对 2 种辅酶的 K_m 值、 K_{cat} 值及 K_{cat} / K_m 值, 如表 2 所示, 该 GDH 催化底物 NADP⁺ 和 NAD⁺ 时, 其比活分别为 8.62 U/mg 和 8.37 U/mg。动力学数据表明 GDH 对 2 种辅酶的 K_m 值、 K_{cat} 值及 K_{cat} / K_m 值相差不大。说明该酶对这 2 种辅酶的亲和力相似, 表现为双辅酶依赖性, 可同时应用于还原性辅酶 NADH 和 NADPH 的再生。

2.6 酶的有机溶剂耐受性

有机溶剂往往是通过破坏蛋白质表面的水化层而使蛋白结构发生变化, 进而导致酶蛋白失活。有机溶剂对葡萄糖脱氢酶活力影响的结果 (图 4) 表明, 该酶对多种有机溶剂具有良好的耐受性。例如: 纯酶液在 50% 的辛烷、环己烷、癸烷中室温放置 1 h 后, 酶活仍能保持 90% 以上; 在 50% 的异戊酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯、二辛醇、二甲亚砜中的残留酶活分别为 46.2%、55.3%、19.2%、21.5%、28.5%。由图 4 的结果可进一步发现, 烷烃类的有机溶剂对其酶活力影响最小, 其次是酯类, 而醇类最容易使酶失活。

2.7 酶的底物特异性

以不同种类的糖为底物, 分别测定了葡萄糖脱氢酶对其它糖的相对活性, 研究结果表明 GDH 具有宽广的底物谱, 对多种糖均表现出一定的催化活性 (图 5)。如以 D-木糖为底物, 催化活性为酶催化葡萄糖活力的 34.4%, 对 D-半乳糖、D-甘露糖、麦芽糖、蔗糖的酶活分别为葡萄糖的 24.6%、24%、18.9%、5.1%, 当酶催化底物果糖时, 几乎检测不到酶活。

3 讨论

基于生物信息学基础, 依据酶蛋白的氨基酸序

建了相应的重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-gdh, 实现了葡萄糖脱氢酶在大肠杆菌中的异源表达。该酶与已经报道的 *Bacillus* sp. G3 葡萄糖脱氢酶最高氨基酸的同源性达 80.3%, 但后者没有报道其是否具

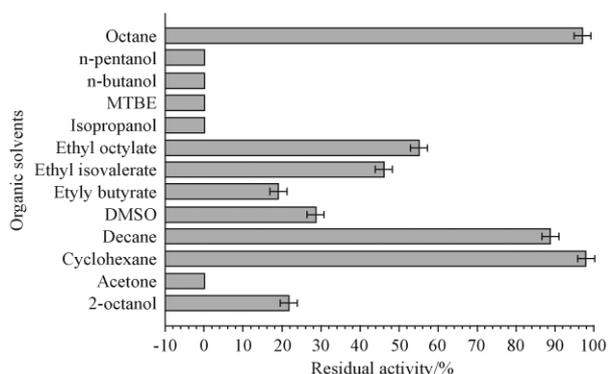


图 4. 有机溶剂对酶活力的影响

Figure 4. Effects of organic solvents on glucose dehydrogenase (GDH) activity.

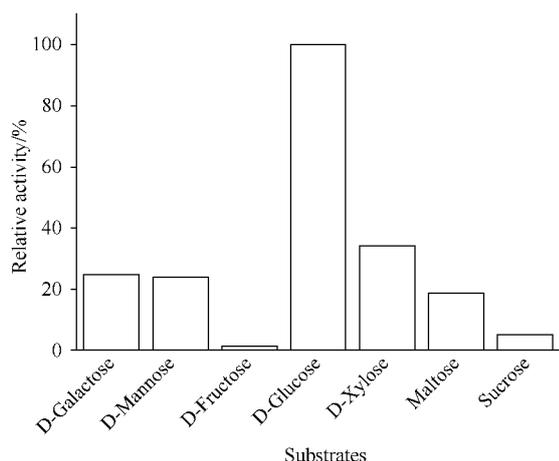


图 5. GDH 的底物特异性

Figure 5. The substrate specificity of glucose dehydrogenase (GDH).

有耐有机溶剂的特性^[18]。该葡萄糖脱氢酶的一个优点是在多种有机溶剂中具有良好的耐受性,研究表明有机介质中的生物催化反应拥有水相反应无法比拟的优势^[15],而有机溶剂耐受性的生物催化酶的筛选是实现该目标的首要环节,然而迄今为止,耐受有机溶剂的葡萄糖脱氢酶的报道却很少^[16-17]。该葡萄糖脱氢酶另一个优点是具有较宽的底物谱,能催化数种不同的糖分子,现已报道的多种葡萄糖脱氢酶只能以 D-葡萄糖作为催化的底物^[19-21]。不同于其它的葡萄糖脱氢酶^[16,18],该葡萄糖脱氢酶对辅酶 NAD⁺ 和 NADP⁺ 具有相似的依赖性,可同时实现两种辅酶 NADH 和 NADPH 的再生循环。该研究成功地挖掘出一新型有机溶剂稳定性的葡萄糖脱氢酶,为氧化还原酶在有机相中的催化反应与辅酶再生循环奠定了较坚实的基础。为了进一步提升该葡

萄糖脱氢酶在工业应用价值,后续的研究将基于定向进化^[22] 和理性设计^[23] 技术,提高葡萄糖脱氢酶的热稳定性。

参考文献

- [1] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409 (6817): 258 - 268.
- [2] Voss CV, Gruber CC, Faber K, Knaus T, Macheroux P, Kroutil W. Orchestration of concurrent oxidation and reduction cycles for stereoinversion and deracemisation of sec-alcohols. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130 (42): 13969 - 13972.
- [3] Zhu DM, Yang Y, Hua L. Stereoselective enzymatic synthesis of chiral alcohols with the use of a carbonyl reductase from *Candida magnoliae* with anti-prelog enantioselectivity. *Journal of Organic Chemistry*, 2006, 71 (11): 4202 - 4205.
- [4] Zhang RZ, Zhu GY, Zhang WC, Cao S, Ou XJ, Li XM, Bartlam M, Xu Y, Zhang XC, Rao ZH. Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-Prelog stereo-specificity. *Protein Science*, 2008, 17 (8): 1412 - 1423.
- [5] Liu WF, Wang P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 2007, 25 (4): 369 - 384.
- [6] Zhang RZ, Xu Y, Sun Y, Zhang WC, Xiao R. Ser67Asp/His68Asp substitution in carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* switches the coenzyme specificity and the enantioselectivity of ketone reduction. *Applied and Environment Microbiology*, 2009, 75 (7): 2176 - 2183.
- [7] Geng YW, Zhang RZ, Xu Y, Wang SS, Sha C, Xiao R. Coexpression of a carbonyl reductase and glucose 6-phosphate dehydrogenase in *Pichia pastoris* improves the production of (S)-4-phenyl-1,2-ethanediol. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2011, 29 (5): 172-178.
- [8] Kaluzna IA, Rozzell JD, Kambourakis S. Ketoreductases: stereoselective catalysts for the facile synthesis of chiral alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16 (22): 3682 - 3689.
- [9] Ye Q, Cao H, Mi L, Yan M, Wang Y, He QT, Li J, Xu L, Chen Y, Xiong J, Ouyang PK, Ying HJ. Biosynthesis of (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate ethyl using *Escherichia coli* co-expressing a novel NADH-

- dependent carbonyl reductase and a glucose dehydrogenase. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (22): 8911 – 8914.
- [10] Matsuyama A, Yamamoto H, Kobayashi Y. Practical application of recombinant whole-cell biocatalysts for the manufacturing of pharmaceutical intermediates such as chiral alcohols. *Organic Process Research & Development*, 2002, 6 (4): 558 – 561
- [11] Yamamoto H, Mitsuhashi K, Kimoto N, Matsuyama A, Esaki N, Kobayashi Y. A novel NADH-dependent carbonyl reductase from *Kluyveromyces aestuarii* and comparison of NADH-regeneration system for the synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68 (3): 638-649.
- [12] Xu ZN, Jing KJ, Liu Y, Cen PL. High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34 (1): 83 – 90.
- [13] Kizaki N, Yasohara Y, Hasegawa J, Wada M, Kataoka M, Shimizu S. Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55 (5): 590 – 595.
- [14] Pollard D, Truppo M, Pollard J, Chen CY, Moore J. Effective synthesis of (S)-3, 5-bistrifluoromethylphenyl ethanol by asymmetric enzymatic reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, 17 (4): 554 – 559.
- [15] Hernaiz MJ, Alcantara AR, Garcia JJ, Sinisterra JV. Applied biotransformations in green solvents. *Chemistry-A European Journal*, 2010, 16 (31): 9422 – 9437.
- [16] Ding HT, Du YQ, Liu DF, Li ZL, Chen XJ, Zhao YH. Cloning and expression in *E. coli* of an organic solvent-tolerant and alkali-resistant glucose 1-dehydrogenase from *Lysinibacillus sphaericus* G10. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (2): 1528 – 1536.
- [17] Heilmann HJ, Magert HJ, Gassen HG. Identification and isolation of glucose dehydrogenase genes of *Bacillus megaterium* M1286 and their expression in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1988, 174 (3): 485 – 490.
- [18] Chen XJ, Ding HT, Du YQ, Lin H, Li ZL, Zhao YH. Cloning, expression and characterization of a glucose dehydrogenase from *Bacillus* sp. G3 in *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5 (32): 5882 – 5888.
- [19] Boontim N, Yoshimune K, Lumyong S, Moriguchi M. Cloning of D-glucose dehydrogenase with a narrow substrate specificity from *Bacillus thuringiensis* M15. *Annals of Microbiology*, 2006, 56 (3): 237 – 240.
- [20] Zhu YB, Chen X, Chen T, Shi SB, Zhao XM. Over-expression of glucose dehydrogenase improves cell growth and riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 2006, 28 (20): 1667 – 1672.
- [21] Tsuya T, Ferri S, Fujikawa M, Yamaoka H, Sode K. Cloning and functional expression of glucose dehydrogenase complex of *Burkholderia cepacia* in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2006, 123 (2): 127 – 136.
- [22] Baik SH, Ide T, Yoshida H, Kagami O, Harayama S. Significantly enhanced stability of glucose dehydrogenase by directed evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61 (4): 329 – 335.
- [23] Vazquez-Figueroa E, Chaparro-Riggers J, Bommaris AS. Development of a thermostable glucose dehydrogenase by a structure-guided consensus concept. *ChemBiochem*, 2007, 8 (18): 2295 – 2301.

Gene cloning and characterization of a solvent-resistant glucose dehydrogenase from *Bacillus* sp. YX-1

Botao Zhang^{1,2}, Rongzhen Zhang^{1*}, Lei Wang¹, Yan Xu^{1*}

¹Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

²Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Science, Tianjin 300308, China

Abstract: [Objective] A gene encoding solvent-resistant glucose dehydrogenase was cloned from *Bacillus* sp. YX-1 and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant enzyme was then characterized. [Methods] The glucose dehydrogenase gene was amplified from *Bacillus* sp. YX-1 genome according to its conserved sequences in *Bacillus* sp. The recombinant enzyme was over-expressed in *E. coli* and purified by HisTrap HP affinity chromatography. The purified enzyme were characterized. [Results] The glucose dehydrogenase gene contains an open reading frame of 786 bp encoding 261 amino acids. The maximum activity was observed at 45°C and pH 8.0. The recombinant enzyme was highly resistant to several organic solvents. More than 90% of the activity was maintained when the enzyme was incubated in 50% cyclohexane, octane, decane at home temperature for 1 h. In addition, the enzyme displayed broad substrate spectrum and has catalytic activity for several sugars to afford reduced coenzymes. It exhibits similar capability to regenerate either NADH or NADPH with specific activity of 8.37 U/mg and 8.62 U/mg for NAD⁺ and NADP⁺. [Conclusion] The organic solvent-tolerant glucose dehydrogenase was explored successfully on the basis of bioinformatics analysis. The work supplied a new biocatalyst for the cofactor-regeneration during the reaction in organic phases catalyzed by oxidoreductases.

Keywords: glucose dehydrogenase, coenzyme regeneration, organic solvent-tolerant, substrate specificity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070059), by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB710800), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z226), by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0498) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP21121)

* Corresponding authors. Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: rzzhang666@yahoo.com.cn, biosean@yahoo.com.cn

Received: 10 December 2012/Revised: 2 February 2013