

极耐热性乳酸脱氢酶高效表达、纯化及酶学性质

钱国军¹, 陈彩平¹, 翟如英¹, 邵蔚蓝², 梅艳珍¹

1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046

2 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212000

钱国军, 陈彩平, 翟如英, 等. 极耐热性乳酸脱氢酶高效表达、纯化及酶学性质. 生物工程学报, 2014, 30(4): 545–553.

Qian GJ, Chen CP, Zhai RY, et al. Expression, purification and characterization of a thermostable lactate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 545–553.

摘 要: 从海栖热袍菌扩增出编码乳酸脱氢酶的基因并将其插入热激载体 pHsh 构建表达质粒, 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中进行表达产生极耐热性乳酸脱氢酶 Tm-LDH。基因表达产物通过热处理, 可以一步获得接近电泳纯的重组酶。酶学性质研究表明, Tm-LDH 的最适反应温度为 95 °C, 最适 pH 7.0; 纯酶在 90 °C 的半衰期为 2 h, 在 pH 5.5–8.0 之间最稳定; SDS-PAGE 结果显示分子量为 33 kDa, 与理论推算值相吻合。以丙酮酸和 NADH 为底物时, 相对于丙酮酸的 K_m 值 1.7 mmol/L, V_{max} 为 3.8×10^4 U/mg; 相对于 NADH 的 K_m 值 7.2 mmol/L, V_{max} 值为 1.1×10^5 U/mg。Tm-LDH 基因在 T7 载体中未能实现高效表达, 但是在热激载体 pHsh 中得到了可溶性超量表达, 表达水平达到 340 mg/L。该酶在 65 °C 反应条件下, 活性达到最高活性的 50%, 并能保持活性不变, 这使该酶能够与常温酶匹配, 在辅酶 NAD 再生体系的建立中具有广泛的用途。

关键词: 极耐热性乳酸脱氢酶, pHsh 热激载体, 辅酶 NAD 再生

Expression, purification and characterization of a thermostable lactate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*

Guojun Qian¹, Caiping Chen¹, Ruying Zhai¹, Weilan Shao², and Yanzhen Mei¹

1 Department of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, Jiangsu, China

2 School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu, China

Abstract: The gene encoding thermostable lactate dehydrogenase (Tm-LDH) was cloned into the plasmid pHsh from

Received: September 3, 2013; **Accepted:** October 15, 2013

Supported by: Natural Science Foundation of Colleges and Universities of Jiangsu Province (No. 11KJB80005), National Natural Science Foundation of China (No. 41306139).

Corresponding author: Yanzhen Mei. Tel/Fax: +86-25-85891523; E-mail: meiyanzhen@njnu.edu.cn

江苏省高校自然科学基金 (No. 11KJB80005), 国家自然科学基金 (No. 41306139) 资助。

Thermotoga maritima, and expressed in *Escherichia coli* JM 109. The recombinant protein was purified to homogeneity by a simple step, heat treatment. The recombinant enzyme had a molecular mass of 33 kDa. The optimal temperature and pH of Tm-LDH were observed 95 °C and 7.0. The purified enzyme had a half-life of 2 h at 90 °C, and exhibited better stability over a pH range from 5.5 to 8.0. The K_m and V_{max} values were 1.7 mmol/L, 3.8×10^4 U/mg of protein for pyruvate, and 7.2 mmol/L and 1.1×10^5 U/mg for NADH, respectively. The expression of Tm-LDH in T7 system could not obtain high efficiency, but it has been soluble over-expression in pHsh system and reached 340 mg/L. The superior stability and productivity of Tm-LDH will lay the foundation of its industrial-scale fermentation and application in the NAD regeneration.

Keywords: thermostable lactate dehydrogenase, pHsh expression system, NAD regeneration

在酶的 6 大类型中, 30%–35%为氧化还原酶^[1], 由于氧化还原酶在催化制备手性醇、氨基酸、羟羧酸方面显示出极大的优势, 因此在制药、食品、精细化工、农药等领域具有重要的用途, 它的应用也越来越受到人们的重视^[2-6]。大约 80%的氧化还原酶需要尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD, NADH) 作为辅酶, 然而 NAD 和 NADH 的价格昂贵, 通常比酶促反应所得产物要贵得多。因此, 从技术经济性的角度来看, 对辅酶进行再生并循环使用很有必要^[7-9]。辅酶因子再生手段主要有化学法、酶法、电化学法、光化学法和基因工程法。酶法是被研究和应用最多的再生手段, 通过偶联的氧化还原反应对辅酶进行再生并循环使用是一个重要策略^[10-16]。

乳酸脱氢酶 (LDH) 是以 NADH 为辅酶, 将丙酮酸经过生化反应生成乳酸, 同时将 NADH 氧化成 NAD^[17]。由于乳酸脱氢酶和其反应底物丙酮酸市场价格相对较便宜, 性质稳定, 因此很早之前 Wong 和 Whitesides 就提出用乳酸脱氢酶进行辅酶 NAD 的再生^[18]。作为辅酶再生的工业用酶, 人们期望所用的酶具有价格低廉、性质稳定、活性高等特点, 极耐热性酶在制备和应用中易于满足这些要求。虽然已经在许多微生物中发现有乳酸脱氢酶, 并且有些已经对

它的酶学性质进行了研究^[19-20], 但是目前已报道的热稳定性乳酸脱氢酶并不多。海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是一种生长在 55–90 °C 的海底火山口附近、严格厌氧的细菌^[21]。海栖热袍菌产生的乳酸脱氢酶具有热稳定性好、活性高等特点, 但是海栖热袍菌生长条件苛刻, 且乳酸脱氢酶 (Tm-LDH) 的产生量很低^[22], 工业用酶需要通过基因重组表达制备。Tm-LDH 基因在 T7 载体中未能实现高效表达, 并且重组酶的酶学性质也未曾报道过^[23]。因此, 研究 Tm-LDH 基因高效表达的基因工程技术及其重组酶酶学性质对于极耐热性 LDH 的开发利用具有重要意义。本研究采用受 σ^{32} 调控的 pHsh 热激表达载体^[24], 对海栖热袍菌的乳酸脱氢酶进行高效表达, 并对其酶学性质进行了研究, 为辅酶再生系统的建立和乳酸的酶法生产技术的发展奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

海栖热袍杆菌 *Thermotoga maritima* MSB8 购自美国菌种保存中心, 编号为 ATCC43589; 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 购于 Promega

(Wisconsin, USA); 质粒 pHsh 由仙奕生物科技 (南京) 南京有限公司 (Shine E Biotech, Nanjing, China) 提供^[24]。

1.1.2 主要试剂

限制酶 T4 DNA 连接酶和 DNA 聚合酶购自宝生物工程公司; 质粒抽提试剂盒, 割胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; 丙酮酸钠, NADH 均购自南京丁贝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件

E. coli 培养在 LB 培养基中, 转化子的选择用含有氨苄青霉素 (10 µg/mL) 的 LB 培养基, 重组酶最高产量测定用含有氨苄青霉素 (10 µg/mL) 的 TB 培养基, 配方见文献[25]。电转化用 SOC 培养基。*T. maritima* 培养基的制备及 *T. maritima* 的接种与培养参考文献[26]。

1.2.2 基因操作

T. maritima 基因组 DNA 提取, DNA 的内切酶水解和连接, DNA 片段的分离, 感受态细胞的制备以及基因的高效电转化均参考文献[25]。质粒的制备, 从琼脂糖凝胶回收 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

1.2.3 乳酸脱氢酶表达载体的构建

根据已经报道的 *T. maritima* 的乳酸脱氢酶基因序列 (TM1867, Accession No. 897800), 以及 pHsh 中的限制性酶切位点设计并合成一对引物 1 和引物 2, 引物 1: 5'-catgccatggctaaaata ggtatcgtaggactcg-3', 其中含有 *Nco* I 酶切位点和起始密码子; 引物 2: 5'-ccgctcgagttaaccgc tgggtgtctgg-3' (含 *Xho* I 酶切位点)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。用此引物, 以 *T. maritima* 菌的基因组 DNA 为模板, PCR 扩

增参数为: 95 °C 5 min; 98 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 35 次; 72 °C 保温 10 min。PCR 扩增结束后, 电泳检测并将 PCR 目标条带割胶回收; 用 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切, 浓缩, 以适当比例与 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切的载体 pHsh 大片段混合并连接, 电转化 *E. coli* JM109, 筛选含 LDH 基因片段的表达质粒 pHsh-ldh。

1.2.4 LDH 基因的表达和重组酶的分离纯化

基因转化和诱导表达方法: 将构建好的重组质粒转入 *E. coli* JM109, 挑取单菌落接入含有氨苄青霉素 (Amp) 抗性的 LB 培养液中。30 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 后转入 42 °C 水浴摇床, 200 r/min 热激诱导 8 h, 离心, 收集菌体细胞。

重组酶的纯化: 将离心收集的细胞用 50 mmol/L 的咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液 (pH 7.0) 重悬, 经高压细胞破碎仪破碎细胞, 13 000×g 离心 15 min, 取上清于 80 °C 热处理 1 h 后, 13 000×g 离心 15 min, 离心上清液过阴离子柱 (离子交换层析), 经 NaCl 离子梯度洗脱, 完成粗酶纯化, 使重组酶达到电泳均一。

1.2.5 酶活性测定

乳酸脱氢酶活性测定采用分光光度法, 以丙酮酸钠和 NADH 为底物, 测定反应体系中 NADH 的下降量^[22]。反应体系为 200 µL, 内含 1 mmol/L 的丙酮酸钠, 1 mmol/L 的 NADH, 7.3 µg 酶, 50 mmol/L 的咪唑邻苯二甲酸氢钾 (pH 7.0)。空白对照中不加酶, 补加等体积的缓冲液, 85 °C 反应 5 min 后, 冰浴中迅速终止反应, 用分光光度计在 340 nm 处测定其吸收值, 计算相对于空白对照的下降值^[22]。

乳酸脱氢酶酶活单位定义: 每分钟氧化

NADH 1 μmol 所需要的酶量定义为一个活性单位^[22]。用 NADH 作标准曲线。蛋白质浓度用 Brandford 法测定。

1.2.6 重组酶的性质分析

重组酶的性质分析均使用热处理后, 并且进一步用 DEAE-Sepharose FF 处理之后的纯酶。

最适反应温度的测定: 在 60–100 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 每隔 5 $^{\circ}\text{C}$ 分别测定酶活 (pH 7.0)。以最高酶活为 100%, 计算相对酶活。

最适反应 pH: 在 pH 4.5–8.0 范围内每隔 0.5 个 pH 单位测定酶活, 缓冲液是 50 mmol/L 咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液。最高活性被设定为 100%, 用以计算相对活性的变化。

温度稳定性: 在酶活性相对稳定的 pH 7.0 下, 缓冲液为咪唑邻苯二甲酸氢钾, 使酶在某个温度下保温不同的时间, 再测定相对酶活, 以 70 $^{\circ}\text{C}$ 保存的酶样活性为 100%, 计算百分比, 确定酶的温度稳定性。

pH 稳定性: 酶在 pH 5.0–8.0 条件下, 缓冲液为咪唑邻苯二甲酸氢钾, 在酶活性相对稳定的温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 1 h 后, 再分别测定残留酶活性, 与不保温酶的酶活相比, 计算百分比, 确定酶的 pH 稳定性。

酶的动力学参数的测定: 以 20 mmol/L 的丙酮酸钠为母液, 分别以 1–20 μL 不等的量加入含有 2 mmol/L 的 NADH 的终体积为 200 μL 酶活反应体系中, 在最适反应条件下, 测定酶活力。采用 Eadie-Hofstee 作图法, 计算动力学参数。

以 100 mmol/L 的 NADH 为母液, 分别以 1–20 μL 不等的量加入含有 2 mmol/L 的丙酮酸钠的终体积为 200 μL 酶活反应体系中, 在最适反应条件下, 测定酶活力。采用 Eadie-Hofstee

作图法, 计算动力学参数。

金属离子及有机抑制剂对酶活性影响的测定: 以 7.3 μg 酶、1 mmol/L 金属离子或者有机抑制剂、1 mmol/L NADH、1 mmol/L 的丙酮酸钠和 50 mmol/L 咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液为 200 μL 反应体系, 在最适反应条件下测定酶活力, 以标准反应体系中的酶活力作为 100%, 计算百分比, 确定金属离子及有机试剂对酶活性的影响。测试的金属离子分别为 Mg^{2+} 、 Li^{+} 、 Sr^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} , 选取的有机抑制剂为 SDS、Triton-X100 和 EDTA。

2 结果

2.1 原核表达质粒的构建

以 *T. maritima* 菌的基因组 DNA 为模板进行乳酸脱氢酶基因片段的 PCR 扩增, 电泳检测结果表明, 在 0.96 kb 附近有一条很亮的扩增带, 与报道的乳酸脱氢酶基因序列大小一致, 没有明显的非特异性条带, 说明所选 PCR 扩增条件能有效扩增基因片段。将 PCR 产物克隆至热激载体 pHsh 中, 构建出重组质粒。用限制性内切酶对重组质粒进行鉴定, 重组质粒能被 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切得到两条分别为 0.96 kb 和 2.3 kb 的条带 (图 1)。因此, 初步证明目标基因已插入热激载体中。

2.2 乳酸脱氢酶基因在 *E. coli* 中的表达及纯化

用重组质粒 pHsh-ldh 和质粒 pHsh 分别转化 *E. coli* JM109, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 后转入 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激诱导 8 h, 收集菌体细胞进行 SDS-PAGE (分离胶的浓度为 12%), 考马斯亮蓝染色的结果见图 2。从电泳图谱上可以看出, 含有重组质粒的 *E. coli* 在分子量 33 kDa 处有明显的蛋白表达带, 酶活

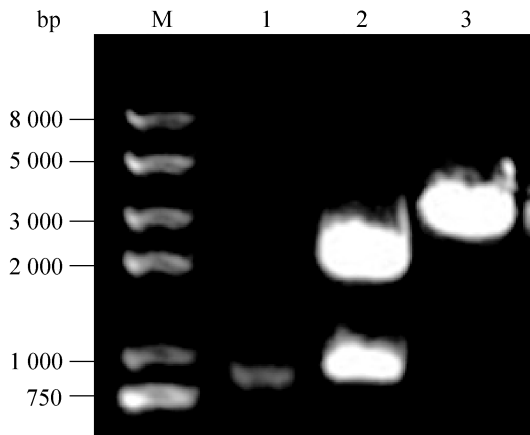


图 1 重组质粒 pHsh-ldh 酶切及 PCR 扩增片段鉴定
Fig. 1 PCR amplification of ldh and restriction analysis of recombinant plasmid. M: DNA marker; 1: PCR amplification of gene; 2: fragments of 2.4 kb and 0.96 kb produced after a double-enzyme digestion of pHsh-ldh; 3: a 3.4 kb fragment produced after a single enzyme digestion of pHsh-ldh.

达到 28 112 U/mL，由此可知乳酸脱氢酶基因通过热激质粒 pHsh 在 *E. coli* 中实现了超量表达。

将热激诱导的菌体细胞通过高压破碎裂解，80 ℃ 热处理 1 h，取上清液 SDS-PAGE 检测，结果表明重组酶经热处理后，酶纯度大幅度提高，基本除去大部分的杂蛋白，纯化结果见表 1。由表 1 可知，经过热处理后，重组酶的蛋白量为 34.1 mg/mL，比酶活也提高到 2 674 U/mg，酶活达到 91 183 U/mL。

表 1 *E. coli* 中重组乳酸脱氢酶的纯化

Table 1 Purification of the recombinant lactate dehydrogenase from *E. coli*

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)
Cell-free extract	28 112	76.6	367	1.0
Heat treatment	91 183	34.1	2 674	7.2
DEAE-Sepharose FF	87 689	26.8	3 272	8.9

2.3 重组酶的酶学性质

酶学性质的研究表明该酶的最适反应温度为 95 ℃，90 ℃ 半衰期为 2 h，95 ℃ 保温 2 h 后能保持约 30% 的活力。有趣的是该酶适应较宽广的反应温度，在 65 ℃ 的反应条件下，该酶的活性达到 50% (图 3)，然而在这种常规温度下酶的活性能够长时间保持稳定 (图 4)。

该酶的最适 pH 为 7.0，从 5.0–7.0 酶活快速升高 (图 5)，但是在 pH 5.5–8.0 之间酶的活力稳定在 60% 以上 (图 6)。

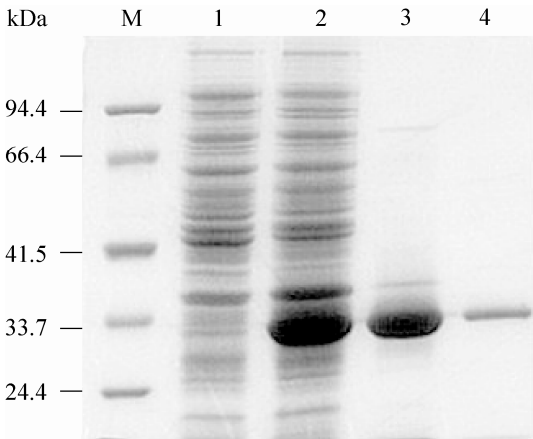


图 2 乳酸脱氢酶纯化过程的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of Tm-LDH in purification steps. M: protein marker; 1: cell-free extract of *E. coli* JM109/pHsh; 2: cell-free extract of *E. coli* JM109/pHsh-ldh; 3: proteins remained after a heat treatment of 1 h; 4: the purified recombinant LDH protein.

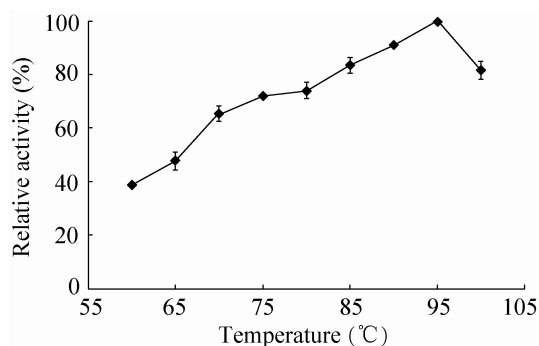


图3 *Tm*-LDH 的最适反应温度

Fig. 3 Optimum temperature for lactate dehydrogenase activity.

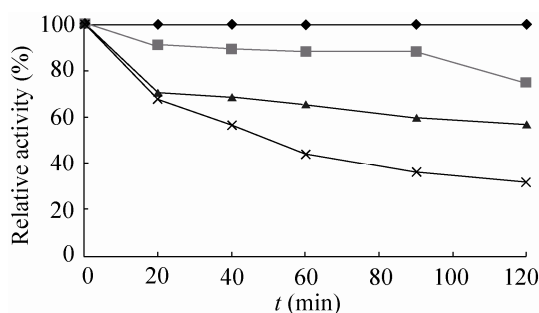


图4 *Tm*-LDH 的温度稳定性

Fig. 4 Thermal stability of lactate dehydrogenase. The purified enzyme was pre-incubated for various time at 65 °C (○), 85 °C (■), 90 °C (▲) and 95 °C (×).

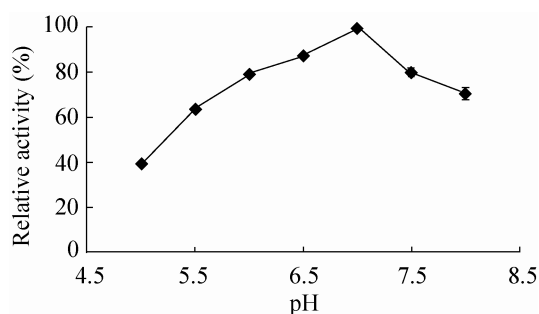


图5 *Tm*-LDH 的最适反应 pH

Fig. 5 Optimum pH for lactate dehydrogenase activity.

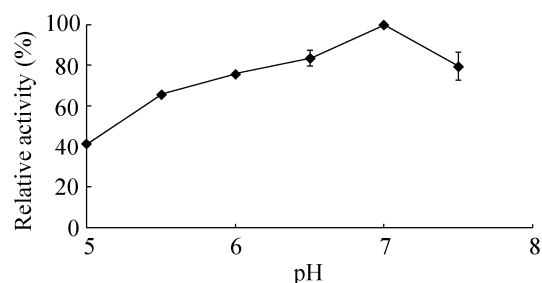


图6 *Tm*-LDH 的 pH 稳定性

Fig. 6 pH stability of lactate dehydrogenase.

由表 2 可知 Mg^{2+} 、 Li^+ 、 Sr^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶的活性没有显著影响；SDS、 Zn^{2+} 对酶活均有显著的抑制作用。 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、Triton-X100 和 EDTA 对酶活有显著的促进作用。以丙酮酸钠和 NADH 为底物时，在 85 °C、pH 7.0 条件下，其丙酮酸钠的动力学参数 K_m 值

表 2 金属离子及抑制剂对 Lactate Dehydrogenase 活性的影响

Table 2 Effect of metal ions and inhibitors on the activity of Lactate Dehydrogenase

Metal ions and surfactants	Lactate dehydrogenase (relative activity, %)
Control	100
Zn^{2+}	45
Mg^{2+}	104
Li^+	105
Ca^{2+}	106
Sr^{2+}	108
Co^{2+}	111
EDTA	113
Mn^{2+}	114
Ni^{2+}	118
Triton-X100	122
SDS	2
Cu^{2+}	106

Various ion reagents were used at 1 mmol/L, EDTA (1 mmol/L), SDS (0.1%, W/V) and Triton-X100 (0.05%, V/V). The activity without a reagent was taken as 100%. Values shown are the mean of duplicate experiments, and the variation about the mean was below 5%.

为 1.7 mmol/L, V_{\max} 值为 3.8×10^4 U/mg; 其 NADH 的动力学参数 K_m 值为 7.2 mmol/L, V_{\max} 为 1.1×10^5 U/mg。

3 讨论

海栖热袍菌 *T. maritima* 是一个嗜极端高温的厌氧真细菌, 生长在 55 °C–90 °C 海底火山口处, 是极端耐热性酶的重要来源。但是海栖热袍菌生长条件苛刻, 细胞密度较低, 不适合工业化生产。基因重组技术是获得重组酶高效生产的有效途径, 但是绝大多数来源于极端高温菌的自然基因在 *E. coli* 中的表达水平很低。因此, 构建合适的极端菌的外源基因表达系统, 高效率地表达一些极端酶, 一直是人们研究的热点。本研究利用 pHsh 表达载体实现了 *Tm*-LDH 的一步超量表达, 克服了传统的海栖热袍菌中乳酸脱氢酶基因工程菌构建困难、乳酸脱氢酶表达量较低等难题。实现超量表达不仅便于获得大量纯酶从而进行酶学性质和应用技术的研究, 而且为该酶的工业化生产奠定了基础。pHsh 表达载体的另一个特点是可以有效地进行热诱导表达, 不需要加入 IPTG 等比较昂贵的化学诱导剂。

酶学性质研究表明 *Tm*-LDH 具有很强的稳定性, 90 °C 酶活半衰期 2 h。有趣的是该酶虽然最适反应条件为 95 °C、pH 7.0, 但是它在较宽广的温度和 pH 范围内活性都很高。该酶在低至 65 °C 的反应条件下活性达到最高活性的 50% (相当于 1 600 U/mg 蛋白), 然而在这种常规温度下酶的活性能够长时间保持稳定。脱氢酶的这种性质对于酶的应用前景尤为重要。在涉及辅酶的氧化还原反应的生物化工过程中,

生产的经济效益和可持续性都要求氧化型或还原型的辅酶能够得到再生。例如, 如果氧化性辅酶 NAD 依赖性的 2,3-丁二醇脱氢酶与 NADH 依赖性乳酸脱氢酶联用, 就可以建立辅酶再生体系, 实现手性乙偶姻和乳酸的持续生产。因此, *Tm*-LDH 适应较宽广的温度和 pH 范围, 有利于它在反应条件方面与不同来源的 NAD 依赖性脱氢酶的配伍, 构建成高效、稳定性的辅酶循环体系。

研究表明, 利用海栖热袍菌乳酸脱氢酶的极耐热性, 将重组菌细胞破碎后的上清经过 80 °C 的热处理后, 无需经过任何色谱层析系统就可获得较高纯度的重组酶, 这大大地简化了重组酶的纯化步骤, 同时也极大地降低了该酶的下游处理成本, 为重组酶的大规模工业化提取奠定了基础。并且发现, 经过热处理之后的重组酶总酶活大幅度提高, 这种实验现象重复性极高, 我们推测可能的原因是由于经过热处理后, 某些对酶活有副作用的因子被去除了; 或者是由于该酶来源于嗜热菌而重组表达是在常温下, 热处理可以通过改变该酶的构象而更好地激活该酶。类似 *Tm*-LDH 热处理之后总酶活大幅度提高的实验现象, 在其他极耐热性重组酶性质分析中也有相关报道, 但均未给出合理解释。对这些现象的研究将有助于我们更进一步了解耐热酶的分子机制, 将有利于微生物极端酶的开发和利用, 更进一步的研究还在进行中。

本研究着重对该重组酶进行了高效表达, 并且对该重组酶的酶学性质进行了分析和测定, 并对该酶在 NAD 再生的工业化应用前景进行了探讨和展望; 但对该酶在 NAD 再生体系中

具体应用还处于探索阶段。我们相信,对该酶在 NAD 再生体系中的更进一步研究,将有利于 NAD 再生体系的完善及在工业化条件下的推广与应用。

REFERENCES

- [1] Lü CQ, Jiang ZY, Wang J. Progress in regeneration of NAD(P) and NAD(P)H. *Chin J Organic Chem*, 2004, 24(11): 1366–1379 (in Chinese).
- 吕陈秋, 姜忠义, 王姣. 烟酰型辅酶 NAD(P)和 NAD(P)H 再生的研究进展. *有机化学*, 2004, 24(11): 1366–1379.
- [2] Hummel W. Large-scale application of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends Biotechnol*, 1999(4): 487–491.
- [3] Straathof A, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(6): 548–556.
- [4] DeSantis G, Davis B. The expanding roles of biocatalysis and biotransformation. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(2): 139–140.
- [5] Huang Y, Liu N, Wu X, et al. Dehydrogenases/Reductases for the synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Curr Org Chem*, 2010, 14(14): 1447–1460.
- [6] Chen Y, Chen C, Wu X. Dicarbonyl reduction by single enzyme for the preparation of chiral diols. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(5): 1742–1753.
- [7] Kim Y, Yoo Y. Regeneration of the nicotinamide cofactor using a mediator-free electrochemical method with a tin oxide electrode. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 44(3): 129–134.
- [8] Wagenknecht P, Penney J, Hembre R. Transition-metal-catalyzed regeneration of nicotinamide coenzymes with hydrogen. *Organometallics*, 2003, 22(6): 1180–1182.
- [9] Berrios-Rivera S, Bennett G, San K. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD dependent formate dehydrogenase. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 217–229.
- [10] Chenault H, Simon E, Whitesides G. Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1988(4): 221–270.
- [11] Johannes T, Woodyer R, Zhao H. Directed evolution of a thermostable phosphite dehydrogenase for NAD(P)H regeneration. *Appl Environ Microb*, 2005, 71(10): 5728–5734.
- [12] Wong C, Whitesides G. Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose 6-phosphate and the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Lenconostoc mesenteroides*. *J Am Chem Soc*, 1981(103): 4890–4899.
- [13] Du W, Yu Z. Biomimetic *in situ* regeneration of cofactors NAD(P)⁺ and NAD(P)H models hantzsch esters and dihydrophenanthridine. *Synlett*, 2012(23): 1300–1304.
- [14] Wichmann R, Vasic-Racki D. Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv Bio Chem Eng Biotechnol*, 2005(92): 225–260.
- [15] Schroer K, Luef K, Hartner F, et al. Engineering the *Pichia pastoris* methanol oxidation pathway for improved NADH regeneration during whole-cell biotransformation. *Metab Eng*, 2010, 12(1): 8–17.
- [16] Lo H, Fish R. Biomimetic NAD models for tandem cofactor regeneration, horse liver alcohol dehydrogenase recognition of 1,4-NADH derivatives, and chiral synthesis. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41(3): 478–481.

- [17] VanderJagt D, Hunsaker L, Heidrich J. Partial purification and characterization of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1981(4): 255–264.
- [18] Wong C, Whitesides G. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*. New York: Academic Press, 1994.
- [19] Xue GX. Progress in lactate dehydrogenase isozyme. *Progr Biotechnol*, 1992(12): 29–32 (in Chinese).
薛国雄. 乳酸脱氢酶(LDH)同工酶研究进展. *生物工程进展*, 1992(12): 29–32.
- [20] Kim M, Whites G. L-Lactate dehydrogenase: substrate specificity and use as a catalyst in the synthesis of homochiral 2-hydroxy acids. *J Am Chem Soc*, 1998(110): 2959–5964.
- [21] Huber R, Langworthy T, Konig H, et al. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol*, 1986, 144(4): 324–333.
- [22] Wrba A, Jaenicke R, Huber R, et al. Lactate dehydrogenase from the extreme thermophile *Thermotoga maritima*. *Eur J Biochem*, 1990(201): 188–195.
- [23] Ostendorp R, Liebl W, Schurig H, et al. The L-lactate dehydrogenase gene of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* cloned by complementation in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1993(206): 709–715.
- [24] Shao W, Wu H, Pei J. Novel expression vector system regulated by sigma32 and methods for using it to produce recombinant protein: US 2007/0254335A1. 2007-11-07.
- [25] Sambrook J, Frisch F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [26] Wang Z, Pei JJ, Shao WL, et al. Expression, characterization and application of thermostable β -glucuronidase from *Thermotoga maritima*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(8): 1407–1412 (in Chinese).
王卓, 裴建军, 邵蔚蓝, 等. 极耐热性 β -葡萄糖醛酸酶的高效表达和酶学性质及其应用. *生物工程学报*, 2008, 24(8): 1407–1412.

(本文责编 郝丽芳)