

## 研究报告

# 谷氨酸脱氢酶与醇脱氢酶的共表达及其在制备 (R)-2-氯-1-苯乙醇中的应用

陈少云\*, 李宏燕

浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

陈少云, 李宏燕. 谷氨酸脱氢酶与醇脱氢酶的共表达及其在制备(R)-2-氯-1-苯乙醇中的应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2062-2075

Chen Shaoyun, Li Hongyan. Co-expression of glutamate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase for preparation of (R)-2-chloro-1-phenylethanol[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2062-2075

**摘 要:**【背景】醇脱氢酶 AdhS 能催化不对称还原反应制备(R)-2-氯-1-苯乙醇,但由于自身再生辅酶 NADH 的能力不足,需要辅酶再生酶协助其再生 NADH。谷氨酸脱氢酶能以谷氨酸为底物,再生辅酶 NAD(P)H,具有辅酶再生酶的潜力。【目的】克隆表达谷氨酸脱氢酶基因 *gdhA*,构建谷氨酸脱氢酶 GdhA 与醇脱氢酶 AdhS 的大肠杆菌共表达体系,提高 AdhS 制备(R)-2-氯-1-苯乙醇的转化效率。【方法】从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 中克隆基因 *gdhA*,并在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中表达,分析辅酶再生活力;再与醇脱氢酶 AdhS 共表达,优化表达条件;分析不同辅酶再生方案对制备(R)-2-氯-1-苯乙醇的转化效率的影响。【结果】谷氨酸脱氢酶 GdhA 再生 NADH 的比活力为 694 U/g。经 GdhA 与 AdhS 的共表达及表达条件优化后,制备(R)-2-氯-1-苯乙醇的转化效率达 465 U/L。经比较,GdhA 协助再生辅酶 NADH,可使 AdhS 制备(R)-2-氯-1-苯乙醇的转化效率提高至约 3 倍。【结论】谷氨酸脱氢酶 GdhA 为 NADH 高效再生酶,与醇脱氢酶 AdhS 共表达可显著提高 AdhS 制备(R)-2-氯-1-苯乙醇的转化效率。

**关键词:** 谷氨酸脱氢酶; 醇脱氢酶; 共表达; (R)-2-氯-1-苯乙醇; NADH

基金项目: 国家自然科学基金(81603254); 浙江省博士后科研项目(BSH1502156)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81603254); Postdoctoral Research Program of Zhejiang Province (BSH1502156)

\*Corresponding author: E-mail: csy@zcmu.edu.cn

Received: 2022-01-29; Accepted: 2022-03-24; Published online: 2022-04-13

## Co-expression of glutamate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase for preparation of (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol

CHEN Shaoyun\*, LI Hongyan

School of Life Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

**Abstract:** [Background] Alcohol dehydrogenase AdhS can produce (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol by catalyzing asymmetric reduction. However, due to its insufficient ability to regenerate coenzyme NADH, coenzyme regenerator is needed to assist NADH regeneration. Glutamate dehydrogenase can regenerate coenzyme NAD(P)H with glutamate as substrate, and has the potential of coenzyme regeneration. [Objective] This study aimed to clone and express glutamate dehydrogenase gene *gdhA*, and construct the co-expression system of glutamate dehydrogenase GdhA and alcohol dehydrogenase AdhS in *Escherichia coli*, for improving conversion efficiency of (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol preparation by AdhS. [Methods] *GdhA* was cloned from *Bacillus subtilis* 168 and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) for the analysis of coenzyme regeneration activity. Then it was co-expressed with alcohol dehydrogenase AdhS to optimize the co-expression condition. Finally, the influence of different coenzyme regeneration schemes on conversion efficiency for (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol preparation was studied. [Results] Specific activity of glutamate dehydrogenase GdhA to regenerate NADH was 694 U/g. The conversion efficiency for (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol preparation reached 465 U/L through co-expression of AdhS and GdhA and optimization of expression conditions. By comparison, the conversion efficiency for (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol preparation by AdhS was improved to about 3 times with NADH regeneration assisted by GdhA. [Conclusion] Glutamate dehydrogenase GdhA can be used for highly efficient regeneration of NADH, and through its co-expression with alcohol dehydrogenase AdhS, the conversion efficiency for (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol preparation by AdhS have been enhanced significantly.

**Keywords:** glutamate dehydrogenase; alcohol dehydrogenase; co-expression; (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol; NADH

氧化还原酶催化的不对称还原反应由于具有选择性强、条件温和、速率快、产率高和副产物少等优点, 广泛适用于制备手性化合物<sup>[1-2]</sup>。然而氧化还原酶大多依赖还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)或还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH), 辅酶会随着产物的生成而消耗, 但NAD(P)H的高成本阻碍了其大规模生产<sup>[3]</sup>。辅酶原位再生是在氧化还原酶催化体系中引入辅

酶再生反应, 实现辅酶的循环利用, 该方法能大大降低反应成本, 是解决辅酶实际应用瓶颈的重要手段<sup>[4]</sup>。目前常用的辅酶NAD(P)H再生酶有葡萄糖脱氢酶<sup>[5]</sup>、甲酸脱氢酶<sup>[3]</sup>、醇脱氢酶<sup>[6]</sup>等。谷氨酸脱氢酶(EC 1.4.1.2–1.4.1.4)能催化氨基酸生成相应的酮酸, 同时再生NAD(P)H<sup>[7]</sup>。谷氨酸脱氢酶多为NADPH依赖型<sup>[8]</sup>, 在手性氨基酸制备中应用较多<sup>[9]</sup>, 而在辅酶NAD(P)H再生中鲜见报道。

醇脱氢酶 AdhS [来源于高加索乳杆菌

(*Lactobacillus kefir*) DSM20587]为 NADH 依赖型醇脱氢酶<sup>[10]</sup>, 能催化不对称还原反应制备(*R*)-2-氯-1-苯乙醇<sup>[11]</sup>, 其产物(*R*)-2-氯-1-苯乙醇为抗抑郁药物氟西汀的关键中间体。前期研究表明<sup>[12]</sup>, 虽然该酶能以异丙醇为底物再生 NADH, 但由于辅酶再生效率低, 不能满足其不对称还原反应对 NADH 的需求, 因此需要引入辅酶再生酶协助其完成辅酶原位再生。

本研究从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 中克隆表达了谷氨酸脱氢酶 GdhA, 并与醇脱氢酶 AdhS 共表达, 构建制备(*R*)-2-氯-1-苯乙醇的偶联催化体系(图 1), 同时优化表达条件和催化体系, 以期提高转化效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

质粒 pET-30a(+)、重组质粒 pCDFDuet-*adhS*、大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 均由本实验室保存。

PrimeSTAR<sup>®</sup> MAX DNA Polymerase、限制性内切酶(*Bgl* II 和 *Xho* I)及 T4 DNA 连接酶, 宝生物工程(大连)有限公司; AxyPrep 质粒 DNA 小量制备试剂盒和 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂

盒, 杭州 Axygen Biotechnology 公司; Competent Cell Preparation Kit、抗生素(Kan 和 Sm)、异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)及 NAD、NADP, 北京鼎国生物技术有限责任公司; PCR 引物合成和基因测序委托上海桑尼生物科技有限公司; HPLC 用(色谱纯)乙腈、甲醇、乙醇和正己烷, 默克试剂公司; 其余试剂和药品均为进口或国产分析纯。

反相液相色谱仪, 杭州旭昱科技有限公司; 正相液相色谱仪, 浙江福利分析仪器有限公司; PCR 仪, 耶拿分析仪器股份公司; 凝胶成像仪, 上海勤翔科学仪器有限公司; 超声破碎仪, 宁波新芝科技研究所。

### 1.2 培养基及大肠杆菌培养

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。用 5 mmol/L 的 NaOH 调 pH 值至 7.0–7.2。配制固体培养基时加琼脂粉 20.0 g/L。

大肠杆菌 BL21(DE3)、DH5 $\alpha$  与枯草芽孢杆菌 168 的培养均采用 LB 培养基, 培养温度为 37 °C, 振荡转速为 180 r/min。

大肠杆菌重组子筛选和工程菌培养时, 按照所携带质粒的抗性添加相应抗生素: 卡那霉素用量为 50 mg/L, 链霉素用量为 50 mg/L。

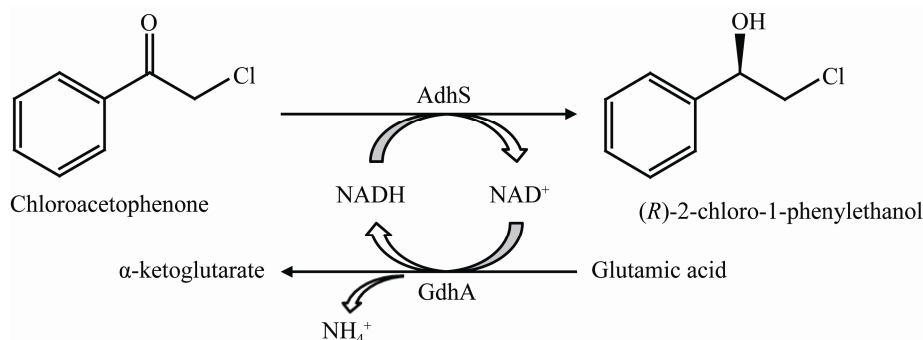


图 1 制备(*R*)-2-氯-1-苯乙醇的偶联催化体系

Figure 1 Coupling catalytic system for preparation of (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol.

### 1.3 基因的克隆

基因 *gdhA* 的 NCBI 序列号为 NC\_000964, 扩增该基因的 PCR 引物为 FE\_ghdA (5'-GAAGATCTCATGTCAGCAAAGCAAGTCTCGAAAG-3') (带 *Bgl* II 酶切位点) 和 RE\_ghdA (5'-CCGCTCGAGTTAGACCCATCCGCGG-3') (带 *Xho* I 酶切位点), 以枯草芽孢杆菌 168 的 LB 培养液为 PCR 模板。基因 *adhS* 的 NCBI 序列号为 EU877965, 基因 *adhS* 验证的 PCR 引物为 FC\_adhS (5'-CGCGGATCCGATGAAATCAACCATTTTGTAAAC-3') (带 *Bam*HI 酶切位点) 和 RC\_adhS (5'-CCCGATATCCTATTTTGTAGCGACAACCAACG-3') (带 *Eco*R V 酶切位点), 以质粒 pCDFDuet-*adhS* 转化后的工程菌的 LB 培养液为 PCR 模板。PCR 反应体系: PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1.5  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 10 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 1 min。经琼脂糖凝胶电泳后, 置于凝胶成像仪中观察后回收目标条带。

### 1.4 重组质粒和工程菌的构建

将回收的目标基因 *gdhA* 条带和质粒 pET-30a(+) 分别用 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切。经琼脂糖凝胶电泳纯化目标条带, 再将基因酶切产物与质粒酶切产物酶连。酶连产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑重组子进行 PCR 验证 (PCR 体系和条件同 *gdhA* 基因克隆), 验证成功的重组子接入 LB 液体培养基, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 12 h 后提取质粒, 送质粒样品进行测序, 测序结果正确的样品可作为重组质粒。大肠杆菌感受态细胞制备采用 Competent Cell Preparation Kit。

重组质粒 pET-*gdhA* 和 pCDFDuet-*adhS* 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态, 再经 PCR 验证 (PCR 体系和条件同基因的克隆), 验证成功的重组子接入 LB 液体培养基, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min

培养至  $OD_{600}$  为 0.8–1.0 时加甘油(甘油终浓度为 20%), -80  $^{\circ}$ C 超低温保存, 即为工程菌 BL-GdhA 和 BL-AdhS。其中, pCDFDuet-*adhS* 中 *adhS* 基因插入载体的位置为 *Bam*HI/*Eco*R V 之间。

重组质粒 pET-*gdhA* 和 pCDFDuet-*adhS* 共转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 再经 PCR 分别验证 *gdhA* 和 *adhS* 基因 (PCR 体系和条件同基因的克隆), 验证成功的重组子活化保存, 即为工程菌 BL-GdhA-AdhS。

### 1.5 工程菌的诱导表达及优化

#### 1.5.1 初次诱导表达

将工程菌接种到 LB 培养基(含相应抗生素)中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 活化培养至  $OD_{600}$  为 0.6, 加 0.5 mmol/L 的 IPTG, 18  $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导 12 h, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用发酵液一半体积的 50 mmol/L 磷酸钠 pH 7.0 缓冲液重悬(用作蛋白质电泳时, 用水重悬), 此为重悬静息细胞液, 备用。

#### 1.5.2 诱导表达条件优化

##### (1) 诱导温度的影响

以温度为变量, 分别设置 4 个水平, 即 18、24、30 和 37  $^{\circ}$ C, 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 进行诱导, 诱导强度为 IPTG 0.5 mmol/L, 诱导时间为 12 h。

##### (2) 诱导时机的影响

以诱导时机为变量分别设置 4 个水平,  $OD_{600}$  分别为 0.3、0.6、0.9 和 1.2, 诱导温度为 24  $^{\circ}$ C, 诱导强度为 IPTG 0.5 mmol/L, 诱导时间为 12 h。

##### (3) 诱导强度的影响

以诱导强度为变量分别设置 4 个水平, IPTG 分别为 0.2、0.5、0.8 和 1.1 mmol/L, 诱导温度为 24  $^{\circ}$ C, 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 时进行诱导, 诱导时间为 12 h。

##### (4) 诱导时间的影响

以诱导时间为变量分别设置 4 个水平, 即 8、

12、16 和 20 h, 诱导温度为 24 °C, 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 时诱导, 诱导强度为 IPTG 0.8 mmol/L。

## 1.6 蛋白质的纯化及 SDS-PAGE 分析

取重悬静息细胞液, 冰浴超声破碎细胞 (225 W 功率超声破碎 5 min, 约 30 次, 每次超声持续 3 s、间歇 7 s), 然后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清作为粗酶液。用缓冲液 A (50 mmol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 20 mmol/L 咪唑) 平衡镍柱。取粗酶液, 以流速 0.2 mL/min 上样 50 mL, 用缓冲液 A 冲洗 10 个柱体积至  $OD_{280}$  值稳定在最低值, 用缓冲液 B (50 mmol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 40 mmol/L 咪唑) 冲洗 10 个柱体积至  $OD_{280}$  值稳定在最低值。用缓冲液 C (50 mmol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 100 mmol/L 咪唑) 洗脱目标蛋白, 待  $OD_{280}$  值上升时开始收集洗脱液, 待  $OD_{280}$  值降到较低时停止收集。最后用 20 kDa 蛋白截留柱脱盐, 再用 50 mmol/L 磷酸钠 pH 7.0 缓冲液重悬, 此为纯酶液, 备用。采用蛋白质 SDS-PAGE 验证蛋白质纯度。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量, 以蛋白质含量(g/L)为横坐标,  $OD_{595}$  吸光值为纵坐标, 可拟合线性方程为:  $y=0.475\ 5x$ ,  $R^2=0.999$  (线性范围:  $0\leq x\leq 1.0$  g/L)。

取粗酶液 10 000 r/min 离心 2 min, 取出上清, 沉淀中加等体积水重悬, 上清和沉淀重悬液中分别加入 SDS-PAGE Loading Buffer, 纯酶液可直接加入 SDS PAGE Loading Buffer, 在 99 °C 热变性 10 min。此为蛋白质电泳样品, 备用。蛋白质 SDS-PAGE 采用 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 点样量 5  $\mu$ L。

## 1.7 酶活力的测定

### 1.7.1 NAD(P)H 再生活力的分析

在石英比色皿中加入 50 mmol/L pH 7.0 磷

酸钠缓冲液 600  $\mu$ L, 5 mmol/L NAD(P) 100  $\mu$ L, 辅酶再生底物(100 mmol/L 谷氨酸 100  $\mu$ L 或异丙醇 20  $\mu$ L), 酶液 100  $\mu$ L, 340 nm 波长动态扫描, 以 0–2 min 的数据拟合线性方程, 记下斜率  $S$  和  $R^2$ 。 $S\times 10^6/6\ 250=\text{NAD(P)H 再生速率} [\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})]$ , 其中 6 250 为摩尔消光系数, 单位为 L/(mol·cm)。

### 1.7.2 氯乙酰苯转化活力的分析

酶活力以每分钟产生 1  $\mu$ mol 产物为 1 U。氯乙酰苯和(R)-2-氯-1-苯乙醇均用反相液相色谱检测。

HPLC 分析条件: 色谱柱为 Welch<sup>®</sup> C18, UF-AA (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5  $\mu$ m); 流动相为乙腈:0.1%甲酸水(体积比为 6:4); 流速 0.8 mL/min; 检测波长 254 nm; 进样量 20  $\mu$ L。氯乙酰苯出峰时间约 8.2 min, (R)-2-氯-1-苯乙醇出峰时间约 6.265 min。

氯乙酰苯定量标准曲线为:  $y=6.286\ 2x$ ,  $R^2=0.998$ 。 $x$ : 目标化合物浓度(mmol/L);  $y$ : 目标峰面积/ $10^6$  (线性范围:  $0\leq x\leq 2.5$  mmol/L)。

(R)-2-氯-1-苯乙醇定量标准曲线为:  $y=7.907\ 3x$ ,  $R^2=0.997$ 。 $x$ : 目标化合物浓度(mmol/L);  $y$ : 目标峰面积/ $10^4$  (线性范围:  $0\leq x\leq 10$  mmol/L)。

### 1.7.3 酶促反应

反应体系: 酶液 70  $\mu$ L, 谷氨酸 20 mmol/L 或异丙醇 20  $\mu$ L, 氯乙酰苯 10 mmol/L,  $\text{NAD}^+$  1 mmol/L, 用 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液补足 700  $\mu$ L。反应条件: 金属浴 30 °C、400 r/min 恒温振荡 1 h 后, 用 3 倍体积的甲醇终止反应, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清, 待测。

拟合 GdhA 酶的米氏方程时, 酶促反应的底物(谷氨酸)浓度分别为 5、10、20、40、80、150 和 250  $\mu$ mol/L, 催化体系中酶蛋白浓度为 0.023 g/L。

### 1.7.4 产物表征

用乙酸乙酯从反应体系中萃取产物, 减压

浓缩, 再通过硅胶柱层析进行纯化。用 NMR 表征产物(R)-2-氯-1-苯乙醇的结构。用正相液相色谱表征产物(R)-2-氯-1-苯乙醇的手性。

2-氯-1-苯乙醇的 NMR 解谱数据:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25  $^\circ\text{C}$ ):  $\delta$  (ppm) 3.713 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 4.782 (m, 1H; CH), 7.341 (m, 5H; Ph-H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 50.680 ( $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 72.762 (CHOH), 126.737, 126.737, 127.824, 128.405, 128.405, 142.602 (Ph)。

HPLC 分析条件: 色谱柱, CHIRALPAK<sup>®</sup> AD-H 250 $\times$ 4.6 mm; 流动相为正己烷:乙醇(体积比为 96:4); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 224 nm; 进样量 5  $\mu\text{L}$ 。(R)-2-氯-1-苯乙醇出峰时间约 16.67 min, (S)-2-氯-1-苯乙醇出峰时间约 18.55 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 谷氨酸脱氢酶 GdhA 的克隆表达

经 GenBank 数据库检索, 得知 *Bacillus subtilis* 168 基因组中含有谷氨酸脱氢酶基因 *gdhA*, 序列号为 NC\_000964, 基因大小为

1 275 bp。活化培养 *Bacillus subtilis* 168, 以菌液为模板、FE\_gdhA/RE\_gdhA 为引物 PCR 扩增该基因, 琼脂糖凝胶电泳验证基因大小, 如图 2A 所示, 大小与预期一致。将所得的谷氨酸脱氢酶基因 *gdhA* 构建入空载质粒 pET-30a(+), 得重组质粒 pET-gdhA, 图谱如图 2B 所示。再将重组质粒 pET-gdhA 转化 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞, 得工程菌 BL21-GdhA。对工程菌 BL21-GdhA 进行低温 IPTG 诱导表达, 蛋白质表达情况用 SDS-PAGE 检测, 如图 3A 所示, 大部分谷氨酸脱氢酶 GdhA 目标蛋白为可溶性表达, 有少量包涵体。收集破胞酶液样品, 过镍柱纯化, SDS-PAGE 检测结果如图 3B 所示, 蛋白质纯化情况良好。用纯化的谷氨酸脱氢酶 GdhA 分别检测 NADH 和 NADPH 再生活力, 得知谷氨酸脱氢酶 GdhA 再生 NADH 的比活力为 694 U/g, 而再生 NADPH 的比活力为 0.48 U/g。可以看出, 谷氨酸脱氢酶 GdhA 为 NADH 辅酶再生酶, 再生 NADPH 的活力接近零。

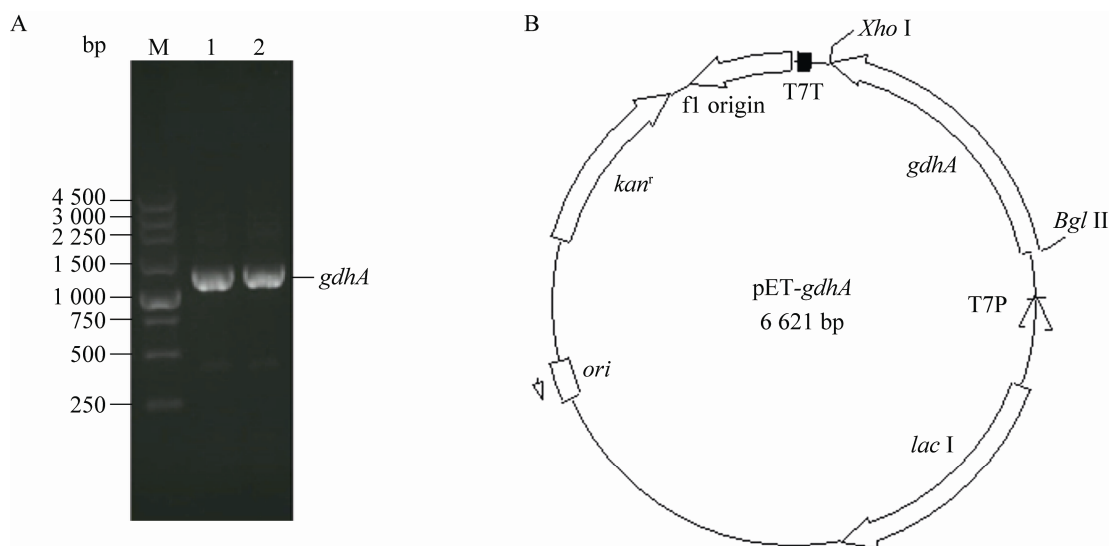
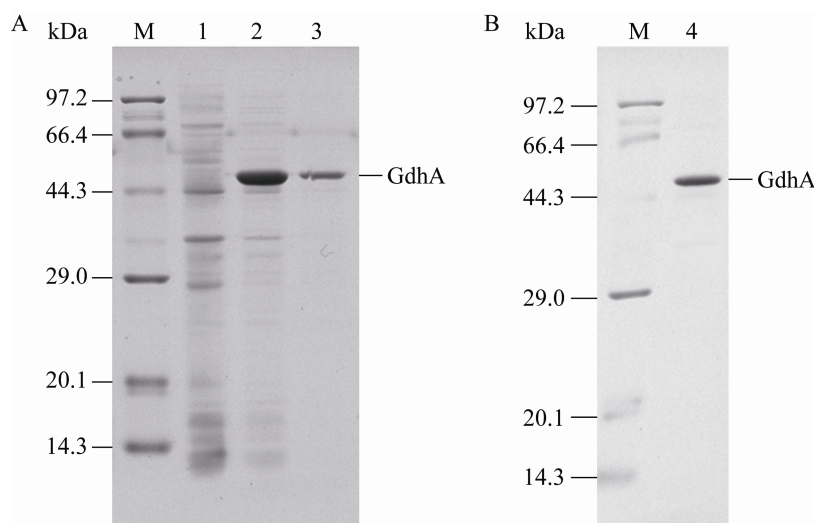


图 2 基因 *gdhA* 电泳图(A)及重组质粒 pET-*gdhA* 图谱(B) M: Marker; 1 和 2: 基因 *gdhA*

Figure 2 Electrophoretogram of gene *gdhA* (A) and diagram of recombinant plasmid pET-*gdhA* (B). M: Marker; 1 and 2: Gene *gdhA*.





**图3 谷氨酸脱氢酶 GdhA 表达及纯化后蛋白质电泳图** A: GdhA 表达蛋白质电泳图; B: GdhA 纯化后电泳图。M: Marker; 1: BL21(pET30)破碎液; 2: BL-GdhA 破胞上清; 3: BL-GdhA 破胞沉淀; 4: 纯化后的 GdhA 蛋白

Figure 3 Protein electrophoretogram of glutamate dehydrogenase GdhA expression and purification. A: Protein electrophoretogram of GdhA after expression; B: Protein electrophoretogram of GdhA after purification. M: Marker; 1: Extract of BL21(pET30); 2: Supernatant extract of BL-GdhA; 3: Sediment extract of BL-GdhA; 4: Pure GdhA protein.

以 GdhA 纯酶液为催化剂, 测不同谷氨酸浓度时(见 1.7.3)的 NADH 再生速率, 拟合米氏方程, GdhA 分子量按 46.64 kDa 计,  $K_m = (19.450 \pm 2.636) \mu\text{mol/L}$ ,  $k_{\text{cat}} = (0.546 \pm 0.097) \text{s}^{-1}$ 。

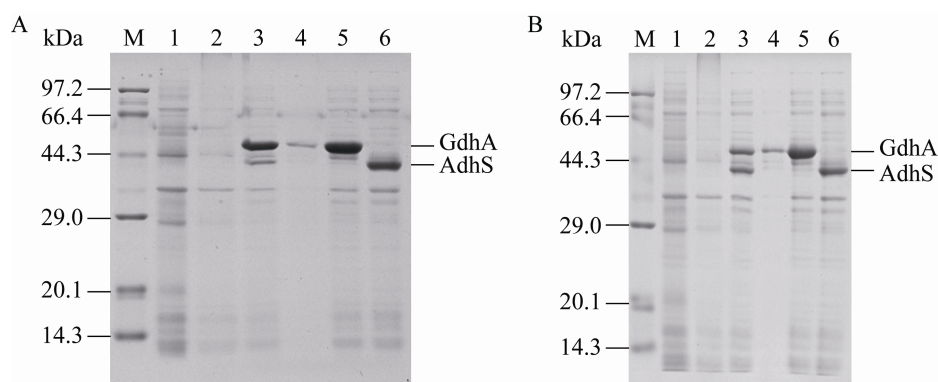
## 2.2 谷氨酸脱氢酶 GdhA 与醇脱氢酶 AdhS 的共表达及表达条件优化

用重组质粒 pET-gdhA 和 pCDFDuet-adhS 共转化 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞, 得工程菌 BL21-GdhA-AdhS。再将工程菌 BL21-GdhA-AdhS 进行低温 IPTG 诱导表达, 表达情况通过 SDS-PAGE 检测。如图 4A 所示, GdhA 和 AdhS 的可溶性表达情况良好, GdhA 有少量包涵体, 而 AdhS 未见包涵体; 但是可以明显看出, AdhS 的总体表达量较少, 2 个酶的表达量不均衡。另外, 经催化活力分析, 得知工程菌 BL21-GdhA-AdhS 可以转化氯乙酰苯, 反应得到(R)-2-氯-1-苯乙醇, 催化活力

为 195 U/L。经萃取收集产物, 减压浓缩, 过层析柱纯化, 做 NMR 确认产物为 2-氯-1-苯乙醇, 同时用正相液相色谱表征其手性, 得产物 ee 值为 93.5%。

考虑到工程菌 BL21-GdhA-AdhS 的初次诱导表达实验中, AdhS 和 GdhA 的表达量未达到很好的匹配, 影响了整体的催化效率, 因此对表达条件进行优化。

(1) 通过对诱导温度进行优化, 分别考察了 18、24、30 和 37 °C 这 4 个水平, 分别检测转化氯乙酰苯为(R)-2-氯-1-苯乙醇的活力。如图 5A 所示, 24 °C 时诱导的催化活力最高; 温度高于 30 °C 时诱导的催化活力明显下降, 可能是由于高温引起了酶蛋白质的不正确折叠, 导致催化活力下降; 24 °C 时的催化活力高于 18 °C 时的催化活力, 可能与 AdhS 的表达情况有关。从图 4B 可看出, 温度升高到 24 °C 并未使 AdhS



**图 4** 谷氨酸脱氢酶 GdhA 与醇脱氢酶 AdhS 共表达优化前后的蛋白质电泳图 A: 优化前的表达情况; B: 优化后的表达情况。M: Marker; 1: BL21(pET30)破碎液; 2: BL21(pCDFDuet)破碎液; 3: BL-GdhA-AdhS 破胞上清; 4: BL-GdhA-AdhS 破胞沉淀; 5: BL-GdhA 破碎液; 6: BL-AdhS 破胞上清

**Figure 4** Protein electrophoretogram of co-expression of glutamate dehydrogenase GdhA and alcohol dehydrogenase AdhS before and after optimization. A: Before optimization; B: After optimization. M: Marker; 1: Extract of BL21(pET30); 2: Extract of BL21(pCDFDuet); 3: Supernatant extract of BL-GdhA-AdhS; 4: Sediment extract of BL-GdhA-AdhS; 5: Extract of BL-GdhA; 6: Supernatant extract of BL-AdhS.

的表达出现明显的包涵体, 因此适当升高表达温度对 AdhS 的表达是有利的。

(2) 通过对诱导时机进行优化, 分别考察  $OD_{600}$  的 4 个水平, 即 0.3、0.6、0.9 和 1.2, 分别检测转化氯乙酰苯为(*R*)-2-氯-1-苯乙醇的活力。如图 5B 所示,  $OD_{600}$  为 0.3 时诱导, 共表达体系的催化活力最低, 可能由于诱导时的细菌浓度太低的缘故; 当  $OD_{600}$  为 0.6 时细菌的生长进入对数期, 此时诱导的效果最好, 催化活力最高; 而  $OD_{600}$  大于 0.9 时诱导效果略有下降。我们认为, 这是由于细菌浓度较高后细菌细胞在诱导过程中会更快进入衰退, 增加了质粒丢失的风险。然而对于双质粒表达系统, 质粒丢失的风险本身就高于单质粒表达系统。因此, 采用刚刚进入对数期不久的表达时机( $OD_{600}$  为 0.6)最合适。

(3) 通过对诱导强度(IPTG 浓度)进行优化, 分别考察 IPTG 浓度的 4 个水平, 即 0.2、0.5、0.8 和 1.1 mmol/L, 分别检测转化氯乙酰

苯为(*R*)-2-氯-1-苯乙醇的活力。从图 5C 可看出, 在 IPTG 浓度不超过 0.8 mmol/L 时, 诱导后的催化活力随着诱导强度的增强而上升, 到 IPTG 浓度 0.8 mmol/L 时达到最高; 而当 IPTG 浓度为 1.2 mmol/L 时, 诱导的催化活力明显下降。主要原因是, 当 IPTG 浓度较高时 IPTG 对细菌细胞的毒性会对细菌的生长造成较明显的影响。

(4) 通过对诱导时间进行优化, 分别考察诱导时间的 4 个水平, 即 8、12、16 和 20 h, 分别检测转化氯乙酰苯为(*R*)-2-氯-1-苯乙醇的活力。如图 5D 所示, 诱导时间从 8 h 到 16 h, 诱导的催化活力逐渐上升, 20 h 时略有下降。由于诱导时间过长, 细菌细胞出现大量老化和自裂解, 因此催化活力会下降。

综合表达条件优化的结果, 最优的表达条件为: 诱导温度 24 °C, 诱导时机  $OD_{600}$  为 0.6, 诱导强度 IPTG 0.8 mmol/L, 诱导时间 16 h。此时诱导的催化活力为 465 U/L, 比优化前的催化活力 195 U/L 提高至 2 倍多, 有明显改善。从



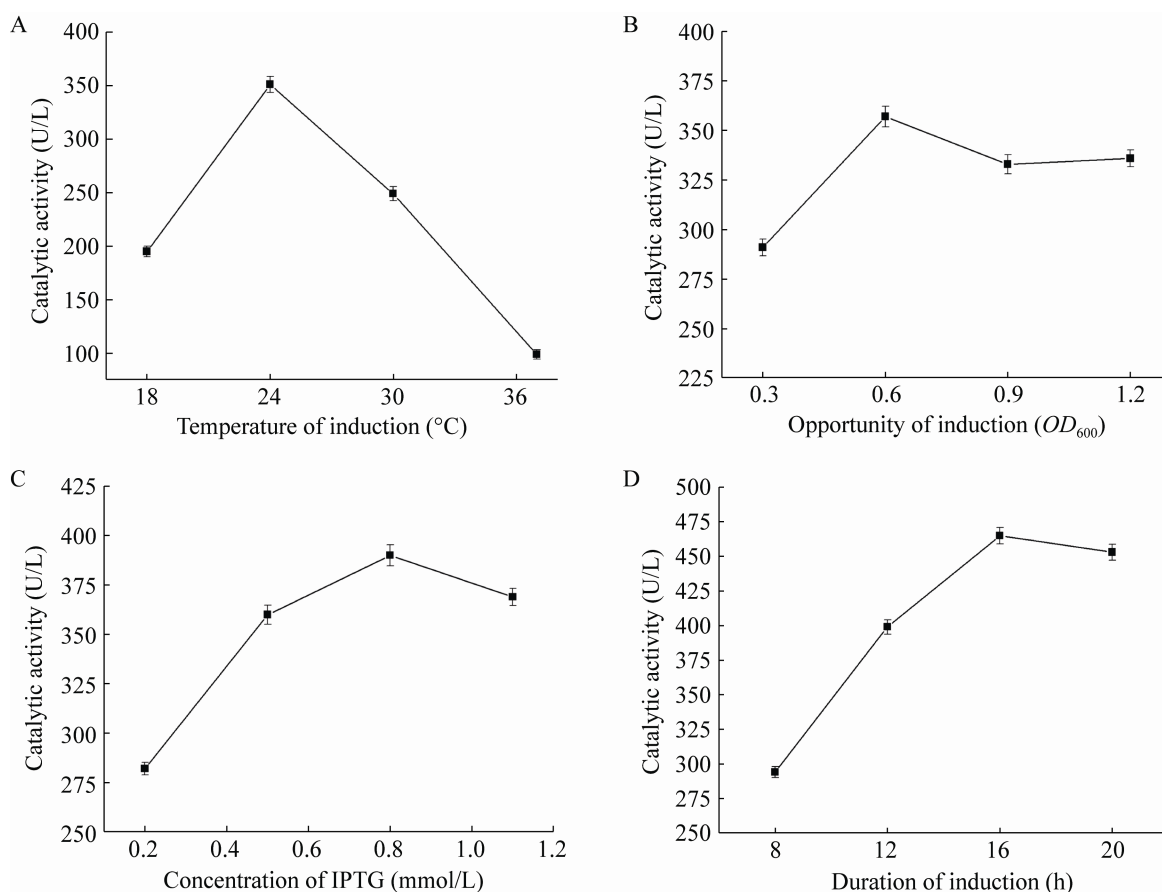


图5 共表达条件对催化活力的影响 A: 诱导温度的影响; B: 诱导时机的影响; C: 诱导强度的影响; D: 诱导时间的影响

Figure 5 Influences of co-expression condition on enzyme activity. A: Influences of induction temperature; B: Influences of induction opportunity; C: Influences of induction intensity; D: Influences of induction time.

优化后的酶蛋白质样品的 SDS-PAGE 检测结果 (图 4B) 可以看出, AdhS 的表达量明显提高, 而且未出现明显的包涵体, AdhS 和 GdhA 的表达量达到了较好的匹配。

### 2.3 不同辅酶再生方案的比较

为进一步了解 GdhA 再生 NADH 对于 AdhS 转化氯乙酰苯为 (*R*)-2-氯-1-苯乙醇的反应活力的影响, 针对 BL21-GdhA-AdhS 做了不同的辅酶再生方案。如图 6 所示, BL21-GdhA-AdhS 仅以异丙醇为辅酶再生底物时转化活力较低, 此时 GdhA 的作用未发挥; 仅用谷氨酸为辅酶再生底物时催化活力明显高于仅用异丙醇, 这

说明 GdhA 的 NADH 再生效率明显高于 AdhS; 当异丙醇和谷氨酸同时加入反应体系时, 催化活力并未高于仅用谷氨酸。由此可以看出, GdhA 依赖谷氨酸为底物再生的 NADH 可完全满足 AdhS 催化还原反应对 NADH 的需求, 此时再加入异丙醇强化辅酶再生已经无必要了。图 6 中方案 1 为 BL21-AdhS 催化的反应, 以异丙醇为辅酶再生底物。同样以异丙醇为辅酶再生底物, 方案 1 的转化活力高于方案 2, 主要由于 AdhS 蛋白质表达量的不同, AdhS 单独表达时的表达量略高于共表达时 AdhS 的表达量 (图 4B 泳道 6 和泳道 3)。综合来看, 方案 3

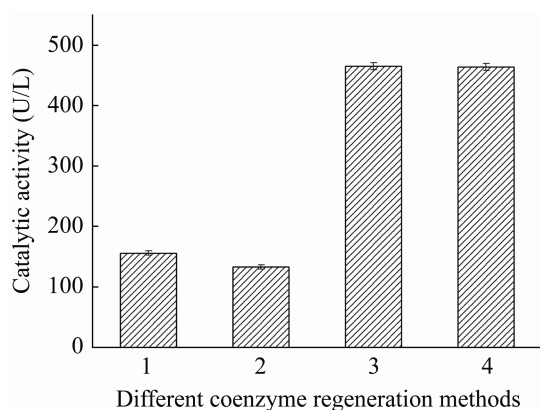


图 6 不同辅酶再生方案对 AdhS 催化活力的影响 辅酶再生底物: 1、2: 异丙醇; 3: 谷氨酸; 4: 异丙醇+谷氨酸。催化剂: 1: BL21-AdhS 粗酶液; 2、3 和 4: BL21-GdhA-AdhS 粗酶液

Figure 6 Influences of different coenzyme regeneration methods on catalytic activity of AdhS. Coenzyme regeneration substrate: 1, 2: Isopropanol; 3: Glutamic acid; 4: Isopropanol+Glutamic acid. Catalyst: 1: Extract of BL21-AdhS; 2, 3 and 4: Extract of BL21-GdhA-AdhS.

为最佳方案。引入 GdhA 与 AdhS 共表达, 依赖谷氨酸为辅酶再生底物, 对于 AdhS 转化氯乙酰苯为(*R*)-2-氯-1-苯乙醇的反应起到了较大的促进作用。比较方案 1 和方案 3 的催化活力, 从 156 U/L 提高到 465 U/L, 提高至约 3 倍。在对 BL21-AdhS (异丙醇为辅酶再生底物) 和 BL21-GdhA-AdhS (谷氨酸为辅酶再生底物) 分别做催化反应时, 反应 3 h 后取样进行 HPLC 检测, 谱图如图 7 所示, 可以看出, BL21-GdhA-AdhS 催化的反应产物峰更高, 底物峰更低, 反应速率明显更快。

## 2.4 温度和 pH 对 BL21-GdhA-AdhS 催化的影响

### 2.4.1 最适温度和温度稳定性

采用 BL-GdhA-AdhS 粗酶液研究了其在不同温度下的催化活力, 如图 8 所示, 反应温度为 40 °C 时催化活力最强, 可达 30 °C 反应活力

的 106%; 另外, 将 BL-GdhA-AdhS 粗酶液在不同温度下保温 1 h, 再调节温度至 30 °C 反应, 发现该酶液在 10–40 °C 保温 1 h 对催化活力无明显影响, 但经 50 °C 保温 1 h 后催化活力明显下降至初始活力的 66%; 60 °C 保温 1 h, 催化活力几乎为零。这说明, 该酶在 10–40 °C 稳定性尚可, 在 50 °C 以上稳定性较差。综合来看, 反应温度控制在 40 °C 最合适。

### 2.4.2 最适 pH 和 pH 稳定性

采用 BL-GdhA-AdhS 粗酶液研究了其在不同 pH 条件下的催化活力, 如图 9 所示, 反应 pH 在 7.0–8.0 时催化活力最强, 而且 pH 7.0 和 pH 8.0 无明显区别; pH 6.0 时该酶液能保持较好的催化活力, 而在 pH < 6.0 或 pH ≥ 9.0 时, 该酶液的催化活力下降明显。另外, 将 BL-GdhA-AdhS 粗酶液在不同 pH 条件下保存 1 h, 再在当前 pH 下做催化反应。结果显示, pH 7.0–8.0 保存 1 h 对 BL-GdhA-AdhS 粗酶液的催化活力无明显影响; 而 pH 6.0 保存 1 h, 该酶液的催化活力存在下降趋势; pH 5.0 和 pH 9.0 保存 1 h, 该酶液的催化活力下降明显; pH ≤ 4.0 或 pH 10.0 保存 1 h, 该酶液的催化活力几乎为零。综合来看, pH 7.0–8.0 为 BL-GdhA-AdhS 的反应最适 pH 值。

## 3 讨论与结论

谷氨酸脱氢酶在微生物及动植物中广泛存在, 主要在辅酶的参与下催化 L-谷氨酸和 α-酮戊二酸的可逆反应, 常由 4 个亚基构成, 单亚基分子量在 10–120 kDa 之间<sup>[13]</sup>。其中, 常见细菌源的谷氨酸脱氢酶单亚基分子量多在 30 kDa 以下, 真菌源的谷氨酸脱氢酶单亚基分子量会略大一些(>40 kDa), 如表 1 所示<sup>[14]</sup>。本文的 *Bacillus subtilis* 源谷氨酸脱氢酶 GdhA 单亚基分子量约为 46.64 kDa, 在同类同源的酶中属于偏

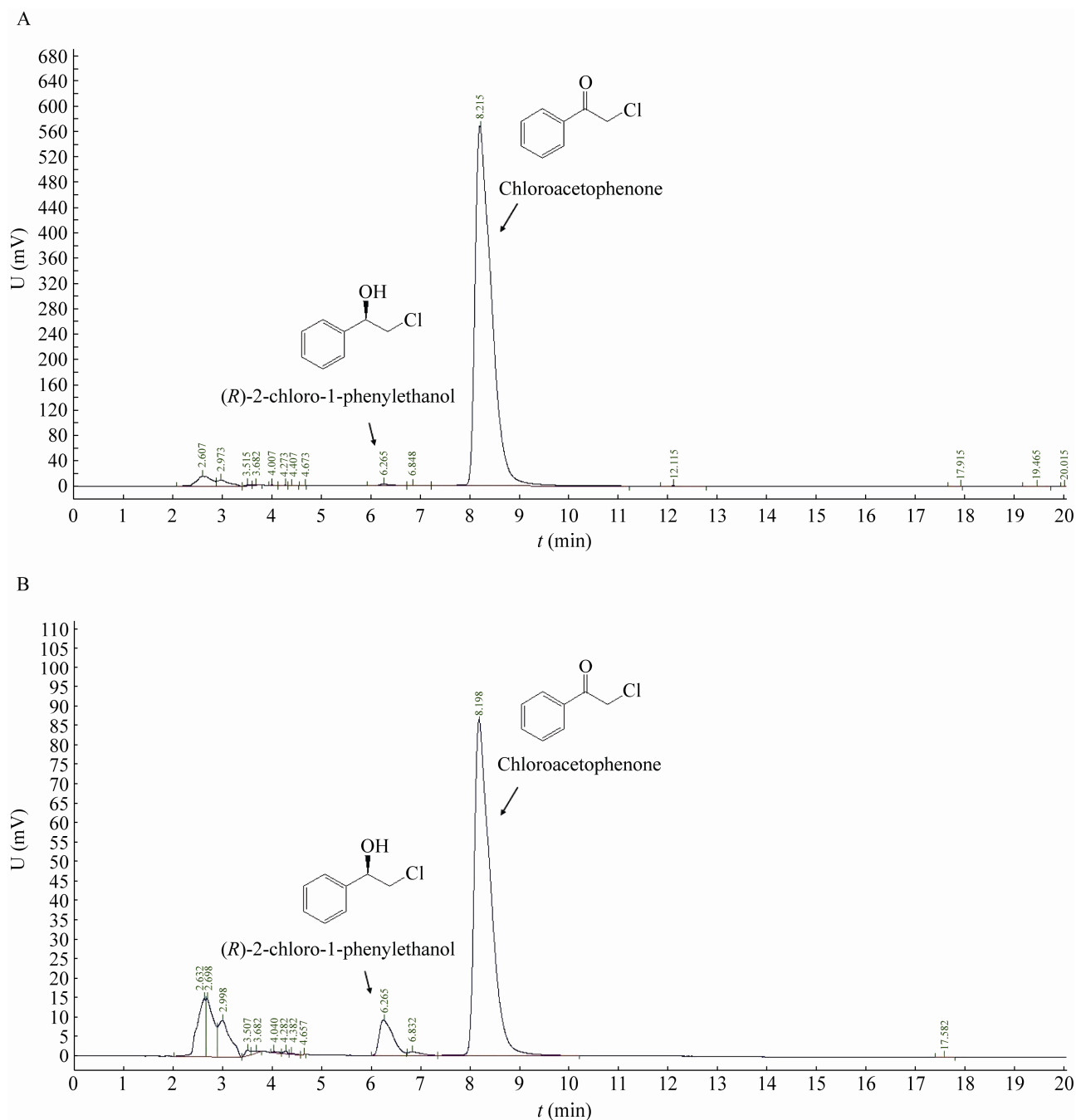


图 7 转化氯乙酰苯为(*R*)-2-氯-1-苯乙醇反应的 HPLC 检测图谱 A: 异丙醇作为辅酶再生底物, BL21-AdhS 粗酶液为催化剂; B: 谷氨酸作为辅酶再生底物, BL21-GdhA-AdhS 粗酶液为催化剂

Figure 7 HPLC diagram of conversion reaction from chloroacetophenone to (*R*)-2-chloro-1-phenylethanol. A: Isopropyl alcohol for coenzyme regeneration, extract of BL21-AdhS as catalyst; B: Glutamic acid for coenzyme regeneration, extract of BL21-GdhA-AdhS as catalyst.

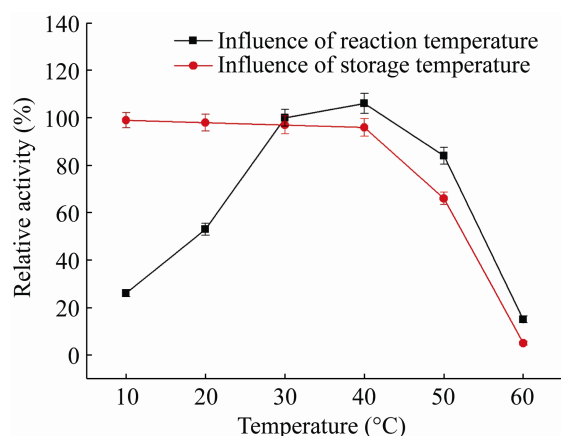


图 8 温度对 BL21-GdhA-AdhS 的影响

Figure 8 Influence of temperature on BL21-GdhA-AdhS.

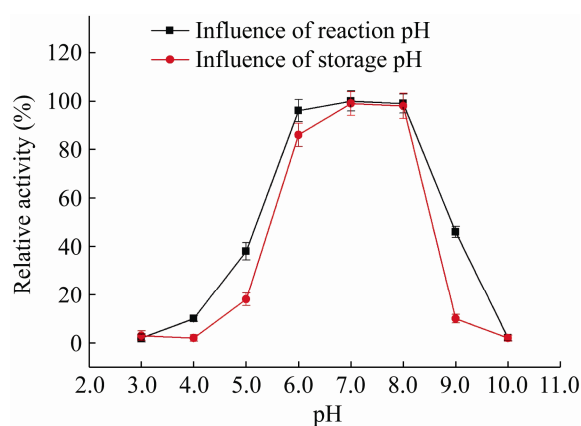


图 9 pH 对 BL21-GdhA-AdhS 的影响

Figure 9 Influence of pH on BL21-GdhA-AdhS.

表 1 不同微生物来源的谷氨酸脱氢酶

Table 1 Glutamate dehydrogenase from different microbial sources

Microbial sources	Subunit molecular weight (kDa)
<i>Escherichia coli</i>	25
<i>Bacillus subtilis</i>	25–27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
<i>Salmonella typhimurium</i>	28
<i>Halobacterium halobium</i>	14–22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
<i>Candida utilis</i>	46
<i>Neurospora crassa</i>	48

大的。在生物催化相关研究中, 谷氨酸脱氢酶主要用于手性氨基酸的制备<sup>[9]</sup>, 极少用于辅酶 NAD(P)H 的再生<sup>[15]</sup>。因为传统观点认为, 该酶在理论上更偏向于  $\alpha$ -酮戊二酸催化合成谷氨酸的还原氨化反应<sup>[16-17]</sup>。

酶学性质研究数据显示, 谷氨酸脱氢酶 GdhA 再生 NADH 的比活力为 694 U/g,  $K_m=(19.450\pm2.636) \mu\text{mol/L}$ ,  $k_{\text{cat}}=(0.546\pm0.097) \text{s}^{-1}$ 。可以说 GdhA 表现出了 NADH 高效再生的能力, 然而其再生 NADPH 的比活力仅为 0.48 U/g。可见该酶在催化谷氨酸氧化脱氨反应时依赖的辅酶为  $\text{NAD}^+$ , 而文献报道的多数谷氨酸脱氢酶均为 NADPH 依赖型<sup>[8]</sup>。另外, GdhA 的  $K_m$  值  $[(19.450\pm2.636) \mu\text{mol/L}]$  相较于文献<sup>[9]</sup>中恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 源的谷氨酸脱氢酶 GluDH 的  $K_m$  值 (0.3 mol/L) 要低很多, 而 GluDH 的  $k_{\text{cat}}$  值为  $6.33 \text{s}^{-1}$ , 本文 GdhA 的  $k_{\text{cat}}$  值  $[(0.546\pm0.097) \text{s}^{-1}]$  却低于 GluDH。这说明, 与同类酶相比, GdhA 与其天然底物谷氨酸的亲合力很强, 然而转化效率却并不高。

本研究通过 GdhA 和醇脱氢酶 AdhS 共表达, 构建工程菌 BL21-GdhA-AdhS, 用于转化氯乙酰苯为 (R)-2-氯-1-苯乙醇的反应, 初始催化活力为 195 U/L。结合图 6 中的数据, AdhS 单独表达活力可达 156 U/L。GdhA 虽然能够促进 NADH 辅酶再生, 但毕竟双酶共表达导致了 AdhS 表达量的下降, 以至于整体催化活力只是略有提升。然而此后的共表达条件优化则很好地解决了 AdhS 表达量的问题。经过优化, 最优的表达条件为: 诱导温度 24 °C, 诱导时机  $OD_{600}$  为 0.6, 诱导强度 IPTG 0.8 mmol/L, 诱导时间 16 h。此时诱导的催化活力为 465 U/L, 比优化前的催化活力 195 U/L 提高至 2 倍多, 改善非常明显; 与 AdhS 单独表达活力 (156 U/L) 相比提高至约 3 倍。前文已经对优化过程及相

关数据做了分析,综合来看,温度对表达效果的影响最显著。低温不利于重组蛋白质的快速表达,而温度过高时重组蛋白质又会来不及折叠而生成大量的包涵体<sup>[18]</sup>。因此,蛋白质的表达速度与折叠速度需要匹配才会有较好的表达效果。不同的酶折叠速度不同,因此需要的表达速度也不同。对于双酶共表达体系而言,需要在各个酶的最适表达速度中找到契合点,即在提高一个酶的有效表达量的同时,尽可能小地影响另一个酶的表达效果。本研究中,重组蛋白质的电泳结果(图4)显示,经过表达条件优化,AdhS的表达量明显提高,而此时GdhA的表达量虽略有下降,但下降不明显。正是由于2个酶有效表达量的匹配,才带来了整体催化效率的提升。

通过不同辅酶再生方案的比较实验可以看出,以谷氨酸为底物时催化活力明显提高,而且在加入谷氨酸后再加入异丙醇并不会再提高催化活力。这说明,谷氨酸脱氢酶GdhA协助辅酶再生对醇脱氢酶AdhS的催化发挥了促进作用,而且GdhA提供的辅酶再生能力可以满足AdhS对辅酶NADH的需求。前文提到,AdhS自身依赖异丙醇再生NADH的效率较低,不能满足其催化加氢还原反应时对NADH的需求。这是由于当一个酶需要同时催化2个独立的反应时,反应的热力学平衡很难达到<sup>[19-20]</sup>。正因为如此,由GdhA提供NADH再生,协助AdhS完成不对称还原反应,才是更好的选择。

通过研究温度和pH对BL21-GdhA-AdhS催化的影响,得知反应最适温度为40℃,反应最适pH值为7.0-8.0,该双酶体系在温度40℃、pH 7.0-8.0的条件下稳定性较好。由于双酶体系涉及到2个酶的最适条件及稳定性,只有在2个酶都较适宜的环境中才能发挥较好的催化效果,因此其最适条件范围往往比单个酶的最

适条件更窄一些。

本研究克隆了谷氨酸脱氢酶GdhA,并在*Escherichia coli* BL21(DE3)中可溶性表达。该酶以谷氨酸为底物,可反应再生辅酶NADH,比活力可达694 U/g。将谷氨酸脱氢酶GdhA与醇脱氢酶AdhS在*Escherichia coli* BL21(DE3)中共表达,得到工程菌BL-GdhA-AdhS。经BL-GdhA-AdhS的表达条件优化,在诱导温度24℃、诱导时机 $OD_{600}$ 为0.6、诱导强度IPTG 0.8 mmol/L和诱导时间16 h时催化活力最高,可达465 U/L。经比较,GdhA协助再生辅酶NADH可使AdhS制备(R)-2-氯-1-苯乙醇的转化效率提高至约3倍。

## REFERENCES

- [1] 郑雅楠,陈少云,刘文洪,郭莹. 基于己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶共表达的辅酶NADPH高效再生[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2619-2626  
Zheng YN, Chen SY, Liu WH, Guo Y. Efficient NADPH regeneration based on co-expression of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase[J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2619-2626 (in Chinese)
- [2] Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2009, 20(5): 513-557
- [3] 程峰,魏澜,王成娇,薛亚平,郑裕国. 甲酸脱氢酶及其在手性生物制造中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 632-649  
Cheng F, Wei L, Wang CJ, Xue YP, Zheng YG. Formate dehydrogenase and its application in biomanufacturing of chiral chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 632-649 (in Chinese)
- [4] Hummel W, Gröger H. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 191: 22-31
- [5] Qian WZ, Ou L, Li CX, Pan J, Xu JH, Chen Q, Zheng GW. Evolution of glucose dehydrogenase for cofactor regeneration in bioredox processes with denaturing

- agents[J]. ChemBioChem, 2020, 21(18): 2680-2688
- [6] Chen X, Zhang H, Maria-Solano MA, Liu W, Li J, Feng J, Liu X, Osuna S, Guo RT, Wu Q, Zhu D, Ma Y. Efficient reductive desymmetrization of bulky 1,3-cyclodiketones enabled by structure-guided directed evolution of a carbonyl reductase[J]. Nature Catalysis, 2019, 2(10): 931-941
- [7] El-Zahab B, Donnelly D, Wang P. Particle-tethered NADH for production of methanol from CO<sub>2</sub> catalyzed by coimmobilized enzymes[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 99(3): 508-514
- [8] 陆利兵, 周海胜, 吴坚平, 杨立荣. NADPH 依赖型谷氨酸脱氢酶的辅酶特异性改造[J]. 生物学杂志, 2021, 38(6): 31-35
- Lu LB, Zhou HS, Wu JP, Yang LR. Coenzyme specific modification of NADPH-dependent glutamate dehydrogenase[J]. Journal of Biology, 2021, 38(6): 31-35 (in Chinese)
- [9] Yin XJ, Liu YY, Meng LJ, Zhou HS, Wu JP, Yang LR. Semi-rational hinge engineering: modulating the conformational transformation of glutamate dehydrogenase for enhanced reductive amination activity towards non-natural substrates[J]. Catalysis Science & Technology, 2020, 10(10): 3376-3386
- [10] Chen QL, Hu YJ, Zhao WJ, Zhu CB, Zhu BQ. Cloning, expression, and characterization of a novel (*S*)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160: 19-29
- [11] Chen SY, Yang CX, Wu JP, Xu G, Yang LR. Multi-enzymatic biosynthesis of chiral  $\beta$ -hydroxy nitriles through co-expression of oxidoreductase and halohydrin dehalogenase[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2013, 355(16): 3179-3190
- [12] 陈少云. 氧化还原酶——卤代醇脱卤酶多酶法合成手性  $\beta$ -羟基腈[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2013
- Chen SY. Multi-enzymatic synthesis of chiral  $\beta$ -hydroxynitriles with oxidoreductase and halohydrin dehalogenase[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2013 (in Chinese)
- [13] Ohshima T, Soda K. Biochemistry and biotechnology of amino acid dehydrogenases[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 1990, 42: 187-209
- [14] 张雨晴. 氨基酸脱氢酶/醇脱氢酶的制备及应用[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2018
- Zhang YQ. Preparation and application of amino acid dehydrogenase & alcohol dehydrogenase[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2018 (in Chinese)
- [15] Liu WF, Zhang SP, Wang P. Nanoparticle-supported multi-enzyme biocatalysis with *in situ* cofactor regeneration[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 139(1): 102-107
- [16] Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism[J]. Cell, 2006, 124(3): 471-484
- [17] Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, Hall MN. Glutaminolysis activates rag-mTORC1 signaling[J]. Molecular Cell, 2012, 47(3): 349-358
- [18] Su LQ, Huang Y, Wu J. Enhanced production of recombinant *Escherichia coli* glutamate decarboxylase through optimization of induction strategy and addition of pyridoxine[J]. Bioresource Technology, 2015, 198: 63-69
- [19] Zhu YH, Liu CY, Cai S, Guo LB, Kim IW, Kalia VC, Lee JK, Zhang YW. Cloning, expression and characterization of a highly active alcohol dehydrogenase for production of ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutyrate[J]. Indian Journal of Microbiology, 2019, 59(2): 225-233
- [20] 朱怡豪. 两种酶偶联再生辅酶 NAD(H)催化体系的构建及应用[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2019
- Zhu YH. Construction of two enzyme-coupled coenzyme NAD(H) regeneration systems and the applications[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2019 (in Chinese)