

【生物工程 / Bioengineering】

固定化双酶耦联体系制备手性胺

任红¹, 郭敏杰¹, 霍鹤宇¹, 姚光晓¹, 王世珍^{1,2}

1) 厦门大学化学化工学院, 福建厦门 361005; 2) 厦门市合成生物学重点实验室, 福建厦门 310065

摘要: 胺脱氢酶(amine dehydrogenase, AmDH)能够在辅酶的作用下不对称还原前手性酮制备手性胺,并与甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)构建耦联双酶反应体系,通过酶活检测与高效液相色谱法得出,AmDH和FDH浓度比为4:1、底物浓度为10 mmol/L、辅酶浓度为0.025 mmol/L时,是游离双酶耦联体系最优反应条件.为提高双酶耦联体系的稳定性,将聚乙烯亚胺-双酶复合物作为模板和催化剂,诱导钛前驱体Ti-BALDH(titanium(IV) bis-(ammoniumlactato)-dihydroxide)缩聚,形成固定化耦联体系.与游离酶体系相比,辅酶可在固定化酶体系的微环境中高效循环再生,大大提高了多酶耦联体系的催化效率.

关键词: 生物催化; 胺脱氢酶; 甲酸脱氢酶; 手性胺; 双酶耦联体系; 固定化酶; 聚乙烯亚胺

中图分类号: Q814

文献标志码: A

doi: 10.3724/SP.J.1249.2019.04354

Biosynthesis of chiral amines with immobilized double enzyme system

REN Hong¹, GUO Minjie¹, HUO Heyu¹,
YAO Guangxiao¹, and WANG Shizhen^{1,2}

1) College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, P. R. China

2) The Key Lab for Synthetic Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361005, Fujian Province, P. R. China

Abstract: Amine dehydrogenase (AmDH) can synthesize chiral amines by asymmetric reduction of prochiral ketones with coenzyme and establish a coupled double enzyme reaction system with formate dehydrogenase (FDH). The results of enzyme activity detection and high performance liquid chromatography show that the optimal reaction condition is that the concentration ratio of AmDH to FDH is 4:1 and the concentration of substrate and the concentration of coenzyme are 10 mmol/L and 0.025 mmol/L, respectively. In order to improve the stability of the system, the polyethylenimine (PEI) coating on the enzyme surface to form polyethyleneimine-diphenylase complex as the template and catalyst is employed for the condensation of Ti-BALDH to form immobilized double enzyme coupling system. Compared with the free double enzyme system, the coenzyme can be recycled and regenerated efficiently in the microenvironment of the immobilized enzyme system. It greatly improves the catalytic efficiency of the multi-enzyme coupling system.

Key words: biocatalysis; amine dehydrogenase (AmDH); formate dehydrogenase (FDH); chiral amine; double enzyme coupling system; immobilized enzyme; polyethylenimine (PEI)

Received: 2018-06-14; Accepted: 2018-08-03

Foundation: National Natural Science Foundation of China (21776233, 41306124); Natural Science Foundation of Fujian Province (2018J01013)

Corresponding author: Associate professor WANG Shizhen. E-mail: szwang@xmu.edu.cn

Citation: REN Hong, GUO Minjie, HUO Heyu, et al. Biosynthesis of chiral amines with immobilized double enzyme system [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2019, 36(4): 354-360. (in Chinese)



<http://journal.szu.edu.cn>

手性胺是香料、医药和有机合成工业的重要中间体^[1]。手性胺不同对映异构体的立体结构的差异使不同的手性对映体的活性不同,作用于生命体时表现出的生理活性和毒害作用也不同^[2]。因此,手性逐渐成为检验药物安全性和药效的重要因素,单一手性对映体药物的比例逐年上升^[3]。手性胺的制备方法主要有化学法和生物催化法,与传统的化学催化剂相比,生物酶催化剂对手性分子的两种对映体具有天然的识别能力,使生物催化技术在手性药物选择性合成中具有显著的优势^[4-5]。此外,生物催化还具有高效、高选择性、条件温和以及环境友好等优点。

胺脱氢酶(amine dehydrogenase, AmDH)能够在辅酶的作用下催化前手性酮和游离氨不对称合成手性胺的,而催化反应过程需要辅酶作为电子传递体参与反应,可以使该反应与辅酶再生系统耦联,如葡萄糖-葡萄糖脱氢酶或甲酸盐-甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)系统。CHEN等^[6]构建了双酶耦联级联反应,利用亮氨酸脱氢酶(EsLeuDH)为模板定向设计获得突变体K77S/N270L与醇脱氢酶耦联合成手性胺。YE等^[7]利用PheDH作为骨架进行酶改造获得的AmDH与葡萄糖脱氢酶耦联制备手性胺,其产物对映体选择性可达99%(对映体过量值)。酶有一般化学催化剂难以匹敌的优点,但仍有一些缺点令它难以在工业生产中广泛使用,其中影响最大的就是酶的稳定性较差。将酶蛋白进行固定化不仅能够提高酶的稳定性,且能够回收重复使用酶蛋白。仿生合成也称模板合成^[8],是模拟生物矿化中生物矿物的形成过程,选择有机物作为模板,在模板的诱导或调控下生成无机物的一种合成方法。2003年,SUMEREL等^[9]首次将硅蛋白(silicatein)用于氧化钛的合成中,结果发现,硅蛋白能作为催化剂诱导钛前驱体二(2-羟基丙酸(二氢氧化二铵合钛))(titanium(IV) bis-(ammoniumlactato)-dihydroxide, Ti-BALDH)的水解和缩聚,并生成无定形的氧化钛,该研究开启了仿生钛化的新篇章。近年来,已有诸多有关基于仿生钛化的有机-无机杂化层层自组装的研究成果应用于酶的固定化方面^[10-12]。支链聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)携有大量带正电的氨基,能够通过静电引力和氢键催化钛前驱体和硅前驱体缩聚,因此,可以用于仿生钛化^[8,13-14]。

本文分别研究了游离AmDH-FDH耦联体系和仿生钛化的AmDH-FDH制备手性胺,旨在探究一

种辅酶循环效率高的多酶耦联体系。

1 材料与方法

1.1 菌株培养及纯酶制备

所用菌株为实验室保存的表达AmDH(源自*Bacillus badius*, Genbank D50261 436-4578)以及表达FDH(源自*Candida boidinii*, Genbank number AJ011046.2)的重组大肠杆菌。将菌种(接种体积分数1%)接种到10 mL含50 μg/L卡那霉素的液体LB培养基中,于37℃、200 r/min下过夜培养。取体积分数为1%的培养菌液转接到100 mL含50 μg/L卡那霉素液体LB培养基中,37℃下培养2~3 h至光密度 $D(600)$ 为0.6~0.8。加入异丙基β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度为0.1 mmol/L,25℃培养12 h后离心收集重组菌体。将菌体用PBS缓冲液冲洗两次后重悬制备菌悬液,用细胞超声破碎仪破壁后离心,上清液即为粗酶液。由于pET-28a(+)质粒带有His6-tag标记,使表达得到的AmDH与FDH带有His6-tag,因而选择GE公司的HisTrap HP柱进行纯化。纯化方法如下:首先用结合缓冲液进行预平衡10个HisTrap HP柱体积,平衡后将蛋白样品注入HisTrap柱,用结合缓冲液平衡20个柱体积,接着用洗脱缓冲液20 mmol/L的磷酸钠缓冲液(含0.5 mol/L氯化钠,500 mmol/L咪唑,pH=7.4)进行梯度洗脱,自动收集流出液,检测其酶活性,收集具有酶活性的纯化样品,以Millipore超滤管(截留分子质量为10 kDa,1 Da=1 u)进行浓缩和脱盐后保存于4℃。

1.2 胺脱氢酶与甲酸脱氢酶反应体系及活性检测

AmDH和FDH分别是还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)和氧化型辅酶NAD⁺依赖型氧化还原酶,NADH在340 nm波长附近有最大光密度值,因此,可通过检测辅酶NADH的消耗或生成速率来计算AmDH和FDH的活性。

酶活力单位的定义:规定条件下,单位体积每分钟催化生成或消耗1 μmol NADH所需酶量为1个酶活力单位(单位:U/mL)。

$$\text{酶活力单位} = (V_T \times \Delta D \times K) / (\varepsilon \times V_S \times L)$$

(1)

其中, V_T 为反应液总体积; V_S 为抽提液样品体积;

<http://journal.szu.edu.cn>

ΔD 为每分钟光密度变化值; K 为样品稀释倍数; ε 为摩尔吸光系数, $\varepsilon = 6.22 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm})$; L 为样品中的光程, $L = 0.5 \text{ cm}$.

1.3 手性胺的催化合成与产物分析

AmDH-FDH 催化生成手性胺的反应体系包括: 200 mmol/L 的氯化铵-氨水缓冲液 (pH = 9.5)、20 mmol/L 的苯氧基-2-丙酮、50 mmol/L 的甲酸铵和 0.05 mmol/L 的 NAD^+ . 将上述溶液置于冰上, 以氨水调节体系 pH = 9.5, 加入适量的 AmDH 与 FDH, 于 30 °C、200 r/min 条件下反应, 每隔一段时间取样保存于 -80 °C 待分析.

产物分析: 将样品置于沸水浴中 15 min 后, 于 $1.3 \times 10^4 g$ 离心 10 min 去除蛋白质沉淀, 加入等体积的正己烷萃取产物, 摇匀, 低速离心 2 min, 取上清, 重复萃取 3 次, 合并萃取液, 以 0.22 μm 滤膜过滤 2 次后用于高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析. 底物酮浓度和产物胺的浓度及光学纯度以 Chiral CEL OD-H 液相色谱柱进行分析.

高效液相色谱条件为: 流动相 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醇}):V(\text{乙二胺}) = 90:10:0.1$, 柱温为 35 °C, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 254 nm.

2 结果与分析

2.1 胺脱氢酶的酶学性质及动力学性质

氧化还原酶与辅酶再生酶的耦联体系中, 耦联并不是单纯的混合, 而是基于各个酶单独的反应条件, 即基于酶的活性和稳定性等因素来选择多酶体系的反应条件; 各个酶反应动力学参数的匹配, 综合考虑酶浓度配比、辅酶与底物的配比, 以及辅酶循环效率等因素. 同时, 还要考虑到底物抑制和产物抑制等限制因素. 因此, 本研究分别测定了 AmDH 与 FDH 的酶学性质及其动力学参数.

利用 HiSTrap HP 柱对分别重组 AmDH 与 FDH 进行纯化得到纯酶, 并用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析其纯度, 结果如图 1, 两个酶的理论大小分别为 41.5 kDa (ku) 和 42 kDa (ku), 电泳结果符合预期.

图 2 为 AmDH 及 FDH 的最适温度及最适 pH 值的测定结果. 实验结果表明, FDH 的最适温度为 30 °C, 而 AmDH 的最适温度为 35 °C. 对于 FDH 而言, 温度对活性的影响并不大, 35 °C 时, 其活性能

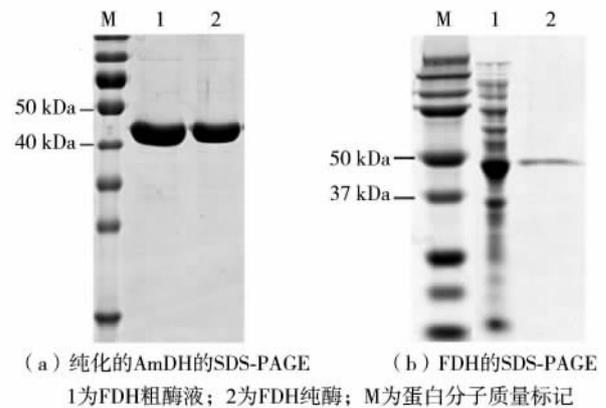


图 1 AmDH 和 FDH 的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified AmDH and FDH

够达到最适温度条件下活性的 90%, 因此, 对于耦联体系的温度, 选择 AmDH 的最适温度, 该条件下 FDH 也保持了较高的酶活力. 通过实验研究 pH 值分别对 AmDH 及 FDH 酶活的影响, 结果如图 2 (c) 和 (d). 由图 2 (c) 和 (d) 可见, 两个酶均是在碱性条件下催化反应, AmDH 的最适 pH = 9.5, FDH 的最适 pH = 8.0, 两酶的最适 pH 值相近, 有利于双酶耦联体系的构建. 双酶参与的反应是在同一反应 pH 值下发生的, 这意味着 pH 值的选择会牺牲掉某个酶的部分活力, 本实验测定的 FDH 活性高于 AmDH, 且 FDH 在 pH = 9.5 条件下仍能保持 80% 的最高活性. 同时, 耦联体系是以 AmDH 反应为主体, 因此采用能够为体系提供游离氨的氯化铵-氨水缓冲液. 耦联反应的催化条件为 35 °C, pH = 9.5 的氯化铵-氨水缓冲液.

对纯化的 AmDH 及 FDH 分别以苯氧基-2-丙酮和甲酸铵为底物, 测定 2 个酶的动力学参数. 反应体系中苯氧基-2-丙酮的浓度为 1.25 ~ 60 mmol/L, 甲酸铵的浓度为 1.25 ~ 100 mmol/L, 在其他条件相同的情况下, 测定不同底物浓度下的 AmDH 及 FDH 酶活力, 根据 Michaelis-Menten 方程计算米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} (表 1). K_m 是表征酶与底物之间亲和力的常数, K_m 越小, 表示酶与底物之间的亲和力越大, 即达到最大反应速率 1/2 时所需要的酶量越小; k_{cat} 表示在最优条件下酶催化生成底物的速率. 在表 1 中, 根据动力学特征计算得到 AmDH 底物苯氧基-2-丙酮的 $K_m = 18.49 \text{ mmol/L}$, $V_{max} = 0.22 \text{ mmol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, FDH 底物的 $K_m = 13.1 \text{ mmol/L}$, $V_{max} = 0.23 \text{ mmol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$. FDH 的 $K_m(\text{NAD}^+)$ 与 AmDH 的 $K_m(\text{NADH})$ 数值相近,

<http://journal.szu.edu.cn>

可以推测,在 FDH 与 AmDH 的耦联反应体系中,FDH 对氧化型辅酶 NAD^+ 的需求量与 AmDH 对还原型辅酶 NADH 的需求量相当. k_{cat}/K_m 的值是衡量一

个酶催化效率的最重要参数,也是考虑了酶转化底物的最大速率与酶与底物之间亲和力的一个综合参数.

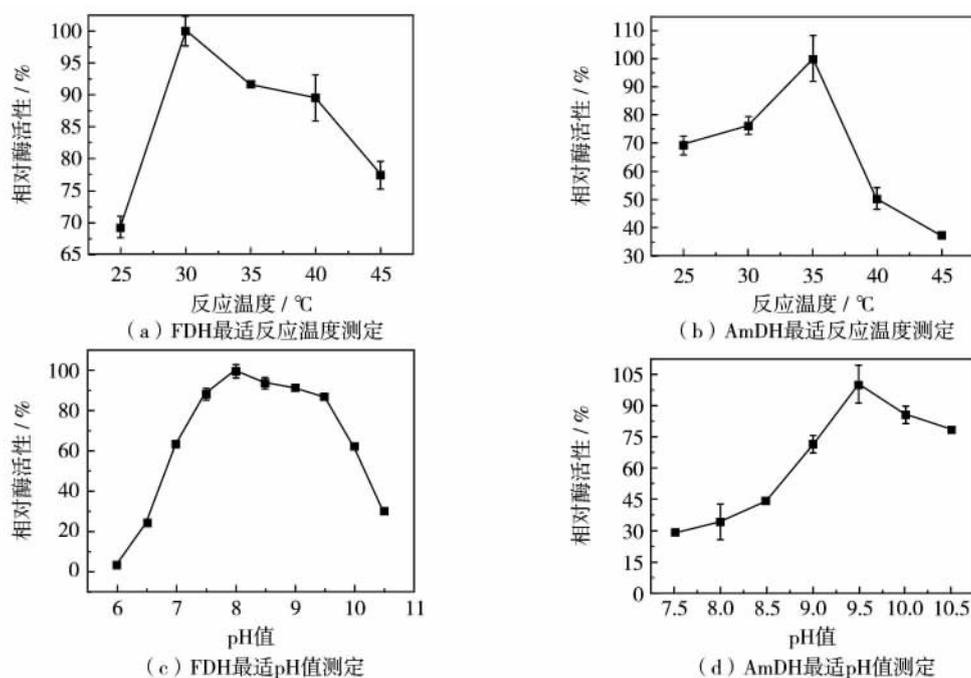


图2 AmDH 和 FDH 的酶学性质 (以各自最高酶活力为 100% 计算)

Fig. 2 The enzymatic property of AmDH and FDH (calculated by the maximum activity of 100%)

表1 AmDH 及 FDH 的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of AmDH and FDH

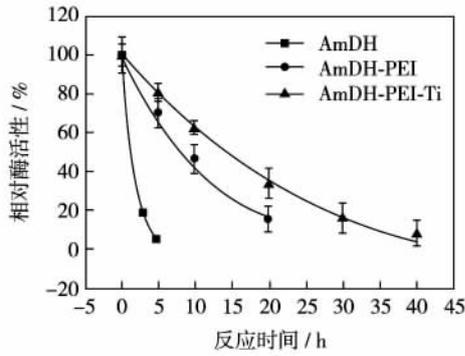
酶	底物	$K_m / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$V_{\text{max}} / (\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1})$	$k_{\text{cat}} / (\text{min}^{-1})$	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1} / (\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$
FDH	甲酸铵	13.10	0.23	21.40	1.63
	NAD^+	0.09	0.04	3.72	41.30
AmDH	苯氧基-2-丙酮	18.49	0.22	8.82	0.48
	NADH	0.07	0.05	3.79	54.20

根据文献 [15] 研究工作,测定了 AmDH 游离酶及固定化酶在不同温度下的稳定性(图 3),随着温度的提高,游离 AmDH 的失活速度越快. AmDH 的稳定性不是很好,其游离 AmDH 在 60 °C 下孵育 5 min 即失活; AmDH-PEI 复合物的在 60 °C 下孵育 20 min 仍可保存 20% 的活性,而 AmDH-PEI-TiO₂ 固定化酶则在 60 °C 下孵育 30 min 仍可保存 20% 的活性. 而 FDH 的稳定性较好,其游离酶可在 60 °C 下保存 30 min 仍存有 30% 的反应活性^[16]. 两个酶相比较而言,在 30 °C 条件下,FDH 比较稳定,且酶活力在反应后期的变化不是很大;而 AmDH 的稳定性较差,在反应初期存在一定的活性降低,中间有较长一段时间的稳定过程,当反应时间超过 120 min 后,AmDH 仅保留 10% 左右的活性. 而且 FDH

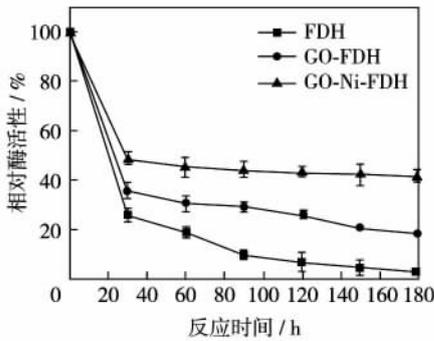
的活性远远高于 AmDH, AmDH 催化的还原胺化反应是整个耦联体系催化的限速步骤,因此,耦联体系的构建初始并未考虑酶稳定性的问题.

2.2 游离胺脱氢酶-甲酸脱氢酶耦联体系的构建

在双酶耦联的催化反应体系中,涉及到两个酶各自催化的氧化还原反应,它们各自催化氧化或还原底物,周而复始的实现辅酶 NADH 的再生与消耗,既相互独立又相互影响. 由于涉及到两个同时发生的氧化还原反应,这使得协调两个酶各自催化反应的速率,进而使提高酶催化效率的过程变得更加重要. 如果一个反应速率过快或过慢,势必会对总体的催化效率及辅酶循环效率产生不利的影响. 纯酶催化体系可以通过在体系中调节适当比例的双酶浓度,使参与反应的两个酶保持较高的催化效



(a) AmDH、固定化酶AmDH-PEI和AmDH-PEI-Ti



(b) 游离酶FDH、固定化酶GO-FDH和GO-Ni-FDH

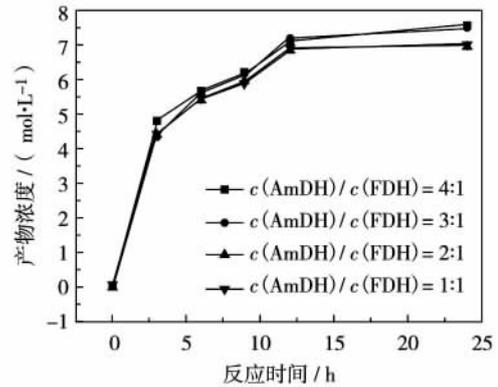
图 3 AmDH、游离酶 FDH 与不同固定化酶的温度稳定性 (60 °C)

Fig. 3 Thermal stabilities of the free and different immobilized AmDH and FDH (at 60 °C)

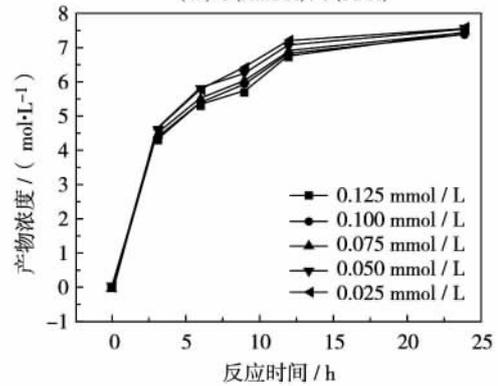
率. 因此, 实验中研究了酶浓度配比、底物浓度和辅酶浓度对游离双酶耦联体系的影响.

实验过程中检测到的 FDH 活性远高于 AmDH, 因此, AmDH 的催化反应是整个催化过程中的限速步骤, 在体系中提高 AmDH 酶和 FDH 酶浓度比, 即提高 $c(\text{AmDH})/c(\text{FDH})$ 比值, 会大大加速反应的初速度. 但 AmDH 与 FDH 的酶稳定性不同也会影响耦联体系催化的过程, 如图 4 (a), 随着反应时间的延长, 酶浓度对于反应速率的影响逐渐减小, 最终反应的转化率没有明显差异, 原因可能是随着反应时间的延长, AmDH 的活性逐渐下降, 对反应的催化作用减弱. 由图 4 (b) 可见, 随着辅酶 NAD^+ 浓度的升高, 产物转化效率明显下降. 原因可能是体系中的辅酶 NAD^+ 同时参与 AmDH 的氧化脱氨反应, 随着辅酶 NAD^+ 浓度的升高, 产物氧化脱氨的速率加快, 导致了产物的总生成速率下降. 同样, 随着反应时间的延长, AmDH 的活性下降, 辅酶浓度对于反应速率的影响逐渐下降, 且对转化率无明显影响. 由图 4 (c) 可见, 随着底物浓度的升高, 产物的生成速率升高, 但是最终反应的转化

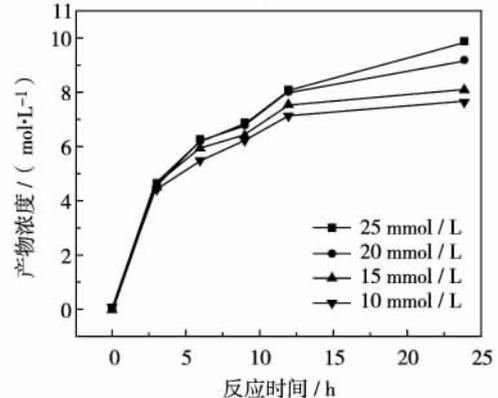
<http://journal.szu.edu.cn>



(a) $c(\text{AmDH})/c(\text{FDH})$



(b) 辅酶浓度



(c) 底物浓度

图 4 $c(\text{AmDH})/c(\text{FDH})$ 、辅酶浓度、底物浓度对生物催化过程的影响

Fig. 4 Effects of AmDH/FDH ratio, coenzyme and substrate concentration on biocatalytic process

率会明显降低. 原因可能是酶的结合位点有限, 随着底物浓度升高, 反应速率会达到饱和, 同时随着反应时间的延长, AmDH 活性逐渐降低, 催化效果下降, 最终导致转化率降低. 分析双酶浓度比、底物浓度和辅酶浓度对游离双酶耦联体系的影响时发现, AmDH 酶的稳定性会大大影响耦联体系的反应速率及转化率, 因此, 提高 AmDH 的稳定性成为影响耦联体系催化效率的重要因素.

2.3 固定化胺脱氢酶-甲酸脱氢酶体系的构建

PEI 是一种水溶性的大分子聚胺, 链上拥有大量的氨基(支链 PEI, 分子链上有伯仲叔胺). PEI 上带有大量的氨基, 当 $\text{pH} < 10$ 时, 其分子链上的氨基多处于质子化状态, 而 AmDH 与 FDH 在 $\text{pH} < 10$ 时带负电, 所以, PEI 对酶分子具有一定的静电吸引作用, 能够通过静电作用使酶分子发生离子吸附而被固定化^[17]. PEI 如“绳子”一般缠绕在酶分子表面, 能够在一定程度上抑制多亚基酶亚基之间的解离. 同时, PEI 可以作为模板和催化剂催化钛前驱体水解缩聚形成二氧化钛^[14], 进一步固定化已

经被 PEI 包裹的酶分子, 提高酶分子的稳定性.

根据文献 [15] 工作, 选择 $\text{pH} = 8.5$ 的 PEI 对 AmDH-FDH 进行包裹, 使 PEI 终浓度达到 0.25 mmol/L 时, 酶的活力达到最大, 且稳定效果也最好. 利用 AmDH-FDH-PEI 复合体作为诱导剂催化钛前驱体 Ti-BLADH 水解缩聚形成包裹着酶分子的 TiO_2 颗粒球. 如表 2, 对 3 种耦联体系来讲, 底物浓度不变时, 辅酶浓度提高, 总转化率 (total turnover number, TTN) 值会下降, 说明辅酶重复利用率会下降. 固定辅酶浓度, 提高底物浓度虽然会提高反应速率, 但是转化率会明显降低.

表 2 底物浓度与辅酶浓度对于游离体系及两种固定化多酶耦联体系的影响

Table 2 Effects of the concentration of substrate and coenzyme on the free system and immobilized multi-enzyme coupling system

底物浓度/ (mmol/L)	NAD ⁺ 浓度/ (mmol/L)	游离体系		PEI 固定化体系		仿生钛化体系	
		TTN/%	转化率/%	TTN/%	转化率/%	TTN/%	转化率/%
10	0.125	59.72	74.66	65.00	81.26	67.30	84.13
10	0.100	73.88	73.88	80.47	80.47	83.33	83.33
10	0.075	99.94	74.96	108.76	81.57	112.57	84.43
10	0.050	150.72	75.36	163.94	81.97	169.66	84.83
10	0.025	301.64	75.41	328.04	82.01	339.52	84.88
25	0.025	392.40	39.24	418.90	41.89	429.80	42.98
20	0.025	365.84	45.73	392.24	49.03	403.28	50.41
15	0.025	323.82	53.97	350.28	58.38	361.62	60.27
10	0.025	304.16	76.04	330.60	82.65	342.04	85.51
5	0.025	199.98	99.99	199.98	99.99	199.98	99.99

综合考虑辅酶的利用率和底物的转化率, 选择辅酶浓度为 0.025 mmol/L 、底物浓度为 10 mmol/L 作为最适反应条件做进一步研究. 其反应过程的进程曲线如图 5. 耦联体系刚开始反应时, 游离体系的转化率最高, 但随着时间的推移, 游离酶活性逐渐降低, 转化率随之下降, 而其他两种固定化酶耦联体系能够较好地维持反应速率. PEI 固定化体系虽然能够在一定程度上抑制酶亚基的解离, 进而稳定酶的活性, 但是, PEI 与酶分子之间是通过静电作用吸附而交联固定的, 其过程是可逆的. 而 AmDH-FDH-PEI 复合物诱导钛前驱体 Ti-BALDH 形成的 TiO_2 包裹的耦联体系, 是化学反应, 形成了有限空间的“笼效应”, 并为催化反应提供了适宜的微环境, 其耦联体系酶活力得以保存, 因此, 随着时间的延长有更好的催化能力. 辅酶可在固定化酶体系所创造的微环境中高效循环再生, 因而提高

了多酶耦联体系的催化效率.

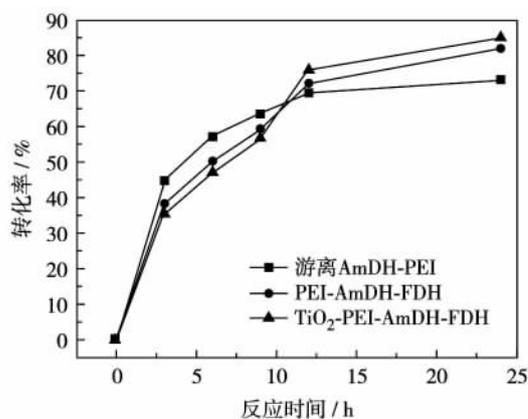


图 5 游离体系、PEI 固定化体系和仿生矿化固定化体系的反应时间-转化率曲线

Fig. 5 Reaction time conversion curve of free system, PEI immobilized system and biomimetic mineralization immobilized system

实验过程均采用纯酶进行反应, 其产物均为 R-苯氧基-2-丙胺, 未能检测到 S 型产物, 3 种耦联体系反应在产物光学纯度上都表现出较好的对映体纯度 (对映体过量值 > 99.9%)。

结 语

通过分别研究 AmDH 与 FDH 的单酶理化与动力学性质, 并基于以上性质对参与耦联体系的双酶的酶活力配比、底物浓度和辅酶浓度进行优化, 进而实现高效经济的辅酶再生循环。采用 PEI 对耦联体系进行固定化, 并进一步利用 PEI-酶复合物诱导钛前驱体 Ti-BALDH 水解缩聚形成 TiO₂, 同时包裹 PEI-AmDH-FDH 形成固定化耦联体系。两种固定化方法过程简单, 所需时间短, 固定化后的酶保持了较高的酶活, 同时具有更高的稳定性。相比游离酶耦联体系, 固定化耦联酶体系可以在低底物浓度和低辅酶浓度条件下保持较高的催化效率。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21776233, 41306124); 福建省自然科学基金资助项目 (2018J01013)

作者简介: 任 红 (1988—), 厦门大学博士研究生。研究方向: 酶工程。E-mail: helen231@126.com

引 文: 任 红, 郭敏杰, 霍鹤宇, 等. 固定化双酶耦联体系制备手性胺 [J]. 深圳大学学报理工版, 2019, 36(2): 354-360.

参考文献 / References:

- [1] CONSTABLE D J C, DUNN P J, HAYLER J D, et al. Key green chemistry research areas: a perspective from pharmaceutical manufacturers [J]. *Green Chemistry*, 2007, 9(5): 411-420.
- [2] KASPRZYK H B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality [J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(11): 4466.
- [3] BROOKS W H, GUIDA W C, DANIEL K G. The significance of chirality in drug design and development [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(7): 760-770.
- [4] LEISCH H, MORLEY K, LAU P C. Baeyer-Villiger monooxygenases: more than just green chemistry [J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(7): 4165-4222.
- [5] DUNN P J. The importance of green chemistry in process research and development [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(4): 1452-1461.
- [6] CHEN Feifei, ZHENG Gaowei, LIU Lei, et al. Reshaping the active pocket of amine dehydrogenases for asymmetric synthesis of bulky aliphatic amines [J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(3): 2622-2628.
- [7] YE Lijuan, TOH H H, YANG Yi, et al. Engineering of amine dehydrogenase for asymmetric reductive amination of ketone by evolving rhodococcus phenylalanine dehydrogenase [J]. *ACS Catalysis*, 2015, 5(2): 1119-1122.
- [8] CORADIN T, LIVAGE J. Effect of some amino acids and peptides on silicic acid polymerization [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2001, 21(4): 329-336.
- [9] SUMEREL J L, YANG Wenjun, KISAILUS D, et al. Biocatalytically templated synthesis of titanium dioxide [J]. *Chemistry of Materials*, 2003, 15(25): 4804-4809.
- [10] JIANG Yanjun, YANG Dong, ZHANG Lei, et al. Preparation of protamine-titania microcapsules through synergy between layer-by-layer assembly and biomimetic mineralization [J]. *Advanced Functional Materials*, 2009, 19(1): 150-156.
- [11] JIANG Yanjun, SUN Qianyun, JIANG Zhongyi, et al. The improved stability of enzyme encapsulated in biomimetic titania particles [J]. *Materials Science & Engineering C*, 2009, 29(1): 328-334.
- [12] JIANG Yanjun, YANG Dong, ZHANG Lei, et al. Biomimetics synthesis of titania nanoparticles induced by protamine [J]. *Dalton Transactions*, 2008(31): 4165-4171.
- [13] YUAN Jianjun, JIN Renhua. Bioinspired synthesis of continuous titania coat with tunable nanofiber-based network structure on linear polyethylenimine-covered substrates [J]. *Langmuir*, 2010, 26(6): 4212-4218.
- [14] SEWELL S L, WRIGHT D W. Biomimetic synthesis of titanium dioxide utilizing the R5 peptide derived from *Cylindrotheca fusiformis* [J]. *Chemistry of Materials*, 2006, 18(13): 3108-3113.
- [15] REN Hong, ZHANG Yonghui, SU Jieru, et al. Encapsulation of amine dehydrogenase in hybrid titania nanoparticles by polyethylenimine coating and templated biomineralization [J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 241: 33-41.
- [16] LIN Peng, ZHANG Yonghui, REN Hong, et al. Assembly of graphene oxide-formate dehydrogenase composites by nickel-coordination with enhanced stability and reusability [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2018, 18(5): 326-333.
- [17] ANDERSSON M M, BRECCIA J D, HATTI-KAUL R. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 32(3): 145-153.

【中文责编: 晨 兮; 英文责编: 艾 琳】

<http://journal.szu.edu.cn>