



## 工程菌发酵产酶及其在 1,3-丙二醇耦合酶催化制备中的应用

彭益强<sup>1</sup>, 庄园<sup>1</sup>, 林志强<sup>1</sup>, 黄文爱<sup>1</sup>, 方柏山<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 华侨大学厦门校区省工业生物技术实验室, 福建 厦门 361021;

<sup>2</sup> 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 培养定向进化后的质粒保藏菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/PET-15b-*dhaT*<sup>-</sup>-24 并进行质粒抽提, 将抽提的质粒转化入感受态宿主细胞 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中得产 1,3-丙二醇氧化还原酶的工程菌。工程菌经乳糖诱导后进行发酵培养获得酶活为 182 U/mL 的 1,3-丙二醇氧化还原酶, 最适反应 pH 值为 10, pH 值稳定范围为 7.0~9.0, 最适反应温度为 55 °C, 温度稳定范围为 30~45 °C。利用工程菌产的 1,3-丙二醇氧化还原酶进行转化 3-羟基丙醛为 1,3-丙二醇的反应, 同时偶联甘油脱氢酶 (由另一工程菌制备) 转化甘油反应进行辅酶 NADH 的再生, 实现了 1,3-丙二醇的双酶耦合的连续反应。由于来源于工程菌的双酶酶学性质相适应, 反应连续进行 34 h 后, 底物 3-羟基丙醛的转化率达 63.4%, 产物 1,3-丙二醇的产率达 64.6%。

**关键词:** 1,3-丙二醇氧化还原酶; 工程菌; 辅酶再生; 1,3-丙二醇

中图分类号: TQ 923

文献标志码: A

文章编号: 1000 - 6613 (2010) 11 - 2143 - 06

## Enzyme from engineering strain and application in 1,3-propanediol coupling-enzymatic catalysis

PENG Yiqiang<sup>1</sup>, ZHUANG Yuan<sup>1</sup>, LIN Zhiqiang<sup>1</sup>, HUANG Wenai<sup>1</sup>, FANG Baishang<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Provincial Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Hua Qiao University, Xiamen 361021, Fujian, China;

<sup>2</sup> College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

**Abstract:** Engineering strain was acquired by transforming directly evolved plasmid from the incubated conservation bacterium *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/PET-15b-*dhaT*<sup>-</sup>-24 to the host cell *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. The lactose induced engineering strain was fermented to acquire 1,3-propanediol oxidoreductase (PDOR) with 182 U/mL activity. The optimal reaction pH was 10 and the pH stable range was 7.0—9.0. The optimal reaction temperature was 55 °C and stable temperature range was 30—45 °C. 3-Hydroxypropionaldehyde (3-HPA) was catalysed by the PDOR to produce 1,3-propanediol (1,3-PD). The reaction was coupled with another reaction of glycerol dehydrogenase (GDH, acquired from another engineering strain) to realize NADH regeneration. Thus, 1,3-PD coupling enzymatic catalysis was constructed. Due to the two enzymes from engineering strains showed suitable characteristics, the reaction was continued for 34 hours and 63.4% translation rate of 3-HPA, 64.6% 1,3-PD production rate were acquired.

**Key words:** 1,3-propanediol oxidoreductase; engineering strain; cofactor regeneration; 1,3-propanediol

1,3-丙二醇 (1,3-propanediol, 1,3-PD) 是一种具有双官能团的化工原料, 可作为抗冻剂、多种增塑剂、洗涤剂、防腐剂和乳化剂的合成原料, 也用于食品、化妆品和制药等行业。其最主要的用途是

收稿日期: 2010-05-24; 修改稿日期: 2010-07-13。

基金项目: 国家 863 计划子课题 (2006AA020103) 及国家自然科学基金资助项目 (20676048)。

第一作者简介: 彭益强 (1973—), 男, 博士研究生。联系人: 方柏山, 教授, 博导, 从事生物化工研究。E-mail fangbs@hqu.edu.cn。

作为聚酯、聚醚和聚氨酯等高分子材料的单体,以1,3-PD为单体合成的聚对苯二甲酸-1,3-丙二醇酯(polytrimethylene terephthalate, PTT)较之以乙二醇为单体合成的聚乙烯对苯二甲酸(polyethylene terephthalate, PET)具有更优良的特性,如优异的回弹性、染色性、抗污性、抗紫外线、臭氧和氮氧化合物的着色性、抗内应力以及低水吸附、低静电、生物可降解性等,是目前化纤新品种开发的热点<sup>[1-2]</sup>。目前,1,3-PD的制备研究集中在生物催化法<sup>[3-5]</sup>,其中生物酶催化法较细胞转化法具有转化率高、副产物少等特点,已成功地构建了源于*Klebsiella pneumoniae*等生产菌的多酶耦合催化制备1,3-PD的生物酶转化体系<sup>[6-8]</sup>。在前期的研究中,发现影响多酶催化体系效率因素有耦合酶的酶活力大小、关键酶酶学性质相适性(如最适反应pH值,最适反应温度等),因此本实验室应用分子改造方法构建了能表达具有新特性关键酶的工程菌<sup>[9-10]</sup>,以期使耦合酶在同一反应体系中有较好的相适性进而可获得较高的催化效率。本文正是在利用发酵法制备另一底物——3-羟基丙醛(3-hydroxypropionaldehyde, 3-HPA)<sup>[11]</sup>的基础上,应用工程菌制备与发酵技术制备关键耦合酶并研究其在构建伴有辅酶再生的双酶催化体系中制备1,3-PD的应用(图1)。

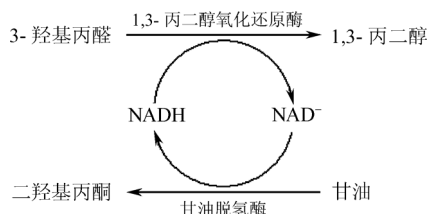


图1 伴有NADH再生的1,3-丙二醇双酶催化耦合体系

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌种及质粒来源

*E. coli* BL21 (DE3) pLysS由系实验室保藏;定向重组菌*E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET15b-*dhaT*<sup>-24</sup>由本实验室构建;pET-15b购自Novagen, Inc.。

### 1.2 培养基

(1) LB培养基 胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母浸膏 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, pH值 7.3,需要时使用前加入 100 μg/mL 氨苄青霉素,固体培养基添加 1.0%琼脂,用于大肠杆菌培养。

(2) 发酵培养基 乳糖 5.5 g/L,甘油 4.5 g/L,酵母浸膏 16.7 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 3.0 g/L。

(3) 筛选培养基 胰蛋白胨 6.0 g/L,酵母浸膏 3.0 g/L, NaCl 10.0 g/L,甘油 18.4 g/L,番红 O 0.1 mmol/L, IPTG 1 mmol/L,琼脂粉 10 g/L, pH值 7.3,需要时使用前加入 100 μg/mL 氨苄青霉素。以上培养基均在 121 °C 高温高压灭菌 20 min。

### 1.3 试剂、缓冲液与仪器

(1) 试剂 辅酶 I, Argase, IPTG (分析纯, TaKaRa 公司), 氨苄青霉素 (分析纯, BBI 公司), 牛血清白蛋白, 二硫代苏糖醇 (DDT) (分析纯, 国药集团), 其余试剂均为国产分析纯。3-HPA (本实验室发酵制备), 甘油脱氢酶 (本实验室工程菌发酵制备, 最适反应 pH 值为 11, 最适反应温度 50 °C, 温度稳定范围为 30~45 °C)。

(2) 缓冲液 50 mg/mL 氨苄青霉素, 用去离子水溶解 1 g 氨苄青霉素, 定容至 20 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装成 1 mL 小份, 避光保存, 用前稀释至所需浓度。

(3) 100 g/L 的过硫酸胺 称 1 g 过硫酸胺, 加去离子水溶解, 并定容至 10 mL, 4 °C 下可保存 2~3 周。

(4) 100 mmol/L IPTG IPTG 为异丙基硫代-β-D-半乳糖苷。用 100 mL 去离子水溶解 2.38 g 的 IPTG, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装成 1 mL 小份, 避光保存于 -20 °C, 使用前稀释至所需浓度。

(5) 50×TAE (pH 值 8.0) 称取 121 g Tris、28.55 mL 冰乙酸和 50 mL 500 mmol/L EDTA (pH 值 8.0), 加去离子水溶解, 并定容至 500 mL, 4 °C 下保存。

(6) 1 mol/L Tris-HCl 称量 121.1 g Tris 置于 1 L 烧杯中, 加入约 800 mL 的去离子水, 充分搅拌溶解, 加入浓盐酸调节所需要的 pH 值 (pH 值 8.3), 将溶液定容至 1 L, 高温高压灭菌后, 室温保存。

(7) TE (pH 值 8.0) 10 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0)、1 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)。配制方法: 取 1 mL 500 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)、5 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) 加入烧杯中, 用去离子水定容至 500 mL 即可。

(8) 仪器 PCR express, Micromax RF 低温冷冻离心机, Micromax 离心机 (Thermo 公司), 凝胶成像系统 (上海天能), WFZ756 型紫外可见分光光度计 (上海光谱)。

### 1.4 质粒提取及感受态细胞培养

(1) 定向重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) /pET15b-*dhaT*<sup>-24</sup> 的培养与质粒的提取 从 -70 °C 取出使

用甘油保藏法保存的 *E.coli* BL21(DE3)/pET15b-*dhaT*<sup>-</sup>-24 菌液, 将其接种于盛有 5 mL LB 培养基(含 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素)的 25 mL 培养管中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下摇床培养 12~16 h, 转速 250 r/min。

(2) 质粒的抽提 使用 Plasmid Mini kit I 试剂盒, 按标准实验手册与参考文献[12], 采用离心方法抽提质粒。

(3) 感受态细胞制备 从 -70  $^{\circ}\text{C}$  取出 1 mL 使用甘油保藏法保存的 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 菌液, 按标准手册与参考文献[12]制成感受态细胞悬液, 16 h 后可直接用做转化实验, 也可于 -70  $^{\circ}\text{C}$  下保存半年。

### 1.5 质料转化与宿主细胞平板培养

转化实验中, 设有阳性对照和阴性对照。其中, 阳性对照用于估计转化效率, 而阴性对照用于消除可能的污染及查明可能的失败原因。其操作步骤如下: ①取感受态细胞 3 份, 如表 1 所示要转化的 DNA 片段体积不应超过感受态细胞的 5%, 温和混合后, 冰浴 30 min; ②将管放入预加温至 42  $^{\circ}\text{C}$  的循环水中, 温浴 90 s, 不要摇动管; ③快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 20~30 min, 缓慢加入 200  $\mu\text{L}$  LB 培养基, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡摇床中预培养 1 h, 转速为 100 r/min, 使细胞恢复正常生长状态; ④将稀释了一定倍数的转化菌液取 50  $\mu\text{L}$  加入已准备好的番红 O 固体筛选培养基(含 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素, 空白对照平板不含)上, 用涂布棒涂匀, 室温下放置 20~30 min, 待菌液充分被吸收后, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中倒置培养 12~16 h 后观察菌落; ⑤挑取单菌落于 2 mL 含相应抗生素的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 8~9 h, 取 720  $\mu\text{L}$  菌液加 80  $\mu\text{L}$  80% 灭菌甘油于 -70  $^{\circ}\text{C}$  下保存, 余下菌液可用于质粒抽提。

### 1.6 重组大肠杆菌诱导表达与粗酶液制备

以乳糖作诱导剂, 诱导步骤及诱导剂浓度如下: ①挑取显均匀桃红色的菌株, 接入 5 mL 含氨苄青霉素(75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养过夜; ②再按 10% 的接种量接入发酵培养基, 于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 2 h; ③在培养

物中添加 2 g/L 乳糖, 25  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续培养 8 h。

粗酶液制备: ①将上述诱导的重组细胞发酵液于 6000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 20 min, 收集菌体, 并用 20 mmol/L、pH 值为 7.4 的磷酸钠缓冲溶液洗涤两次; ②按每毫升细胞培养物的细胞沉淀, 用 300  $\mu\text{L}$ 、20 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液和 2 mmol/L 二硫苏糖醇重悬菌体。③将装有 20 mL 菌悬液的离心管置于冰浴中, 细胞破碎仪探头置于液面下 1 cm, 超声功率为 400 W, 间歇频率 0.5 (1 s 内, 超声 0.5 s, 间歇 0.5s), 超声时间 4 min, 破碎后的悬浮液于 8000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  下离心 30 min。将上清液用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后即即为无细胞抽提液。然后测定其最适反应 pH 值与最适反应温度及相应稳定范围。

### 1.7 1,3-丙二醇的双酶耦合催化反应体系的构建

以  $\text{NAD}^+$  为起始辅酶, 以一定浓度的 3-HPA 和甘油进行偶联反应。反应条件为: pH 值 9.0, Tris-HCl 缓冲体系, 反应总体积 10 mL。按顺序加入 0.05 g 0.3 mol/L 甘油、2 mL 11.3 mg/mL 3-HPA、16 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 9.0)、0.5 mg 70 U/mg GDH、85  $\mu\text{L}$  的 182 U/mL PDOR、5.3 mL 去离子水, 最后加入 0.0038 g  $\text{NAD}^+$  启动反应。然后置于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴恒温反应器中, 在 0、2、4、5、7、8、9、10、18、21、25、29、34 h 附近各取样 500  $\mu\text{L}$ , 经沸水浴加热 10 min, 10000 r/min 离心 5 min, 取上清液稀释 10 倍, 再用高效液相色谱分析反应液中的底物 Gly、3-HPA 与产物 1,3-PD、DHA 的含量。

### 1.8 分析方法

(1) PDOR 酶活测定 采用初速度法, 由于没有商品化的 3-HPA, 使用逆反应测定。1.5 mL 反应液 [含碳酸钾缓冲溶液 (pH 值为 9.5)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 、1,3-丙二醇、 $\text{NAD}^+$  储液各 150  $\mu\text{L}$ , 去离子水 650  $\mu\text{L}$ ] 加入适当稀释的酶液 100  $\mu\text{L}$  启动反应, 340 nm 连续测定吸光度变化值后计算酶活。PDOR 的活力定义为: 在上述条件下, 每分钟还原 1  $\mu\text{mol}$  1,3-丙二醇的酶量为 1 个单位<sup>[6-7]</sup>。

(2) Gly、3-HPA、1,3-PD 与 DHA 的含量测定 采用高效液相色谱法, 条件与过程参考文献[6-7]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质粒转入感受态细胞的筛选

将成功提取的质粒与处于感受态的宿主菌 *E.*

表 1 质粒转化体系

I. 管	II. 阳性对照	III. 阴性对照
感受态细胞 100 $\mu\text{L}$	感受态细胞 100 $\mu\text{L}$	感受态细胞 100 $\mu\text{L}$
连接产物 5.0 $\mu\text{L}$	载体 5.0 $\mu\text{L}$	双蒸水 5.0 $\mu\text{L}$

*coli* BL21 (DE3) pLysS 细胞温和混合, 涂布于番红 O 琼脂筛选平板上, 在 37 °C 下培养约 12 h 后, 筛选平板上出现了分散的菌落, 挑取平板上呈现均匀桃红色的菌落即是质粒成功转入感受态细胞的菌落。琼脂平板筛选, 是指在特殊条件下(如利用营养缺陷型或添加抗生素的培养基、高温、酸碱环境等)培养突变菌, 通过宿主菌的生长与不生长、培养基颜色变化等, 判断是否具有目的基因。van Loo 等<sup>[13]</sup>在此基础上提出一种对环氧化物水解酶平板筛选的番红 O 琼脂平板筛选方法, 其原理是 *E. coli* 中环氧化物水解后得到的二醇具有氧化能力, 被氧化的 NADH 的释放通过呼吸链使得膜电势升高, 产生强质子流, 增强了细胞对番红 O 的摄入与聚集, 从而使具有环氧化物水解酶活力的克隆显示均匀的桃红色, 而无活力的克隆则显示透明圈。根据此原理, 本实验保藏的质粒含有编码以 NADH 为辅酶的 1,3-丙二醇氧化还原酶的基因片段, 若此质粒成功转化入细胞则可使相应生长菌落由于细胞内聚集了番红 O 而呈均匀红色, 从而显示具有 PDOR 酶活性的克隆, 而无活性的克隆外围则是一个透明圈。

## 2.2 重组菌诱导表达与无细胞抽提液的制备

*lac* 启动子控制下的表达都以异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 作为诱导剂, 但由于其价格昂贵且具有一定的毒性, 在制药工业中受到限制<sup>[14]</sup>。用乳糖代替 IPTG 作诱导剂的研究在不断深入<sup>[15-16]</sup>, 研究表明乳糖借助乳糖酶的作用进入细胞, 在  $\beta$ -半乳糖苷酶作用下生成异乳糖, 异乳糖具有诱导剂的作用。本实验挑取的菌落经过扩大培养后加入乳糖进行酶的诱导表达, 再培养 8 h 后菌体生长旺盛, 培养液出现稍许混浊, 培养液离心沉淀, 每 50 mL 培养液可沉淀出 1 mL 的细胞聚集体, 细胞洗脱后超声破碎, 低温下 8000 r/min 离心得到澄清的无细胞抽提液, 即重组 PDOR 粗酶液。

## 2.3 PDOR 粗酶液的酶学性质测定

分别配制 pH 值为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 的酶活缓冲液。在其它条件不变、pH 值为单一变量的情况下, 测定各个 pH 值下的重组 PDOR 酶活力。以最大酶活为标准, 做出相对酶活与 pH 值曲线图, 结果如图 2 (a) 所示。在 pH 值为 10.0 时, PDOR 的酶活最大。在 pH 值 7.0~12.0 范围内, 将酶液分别置于相应的酶活缓冲液中, 静置保温 1 h,

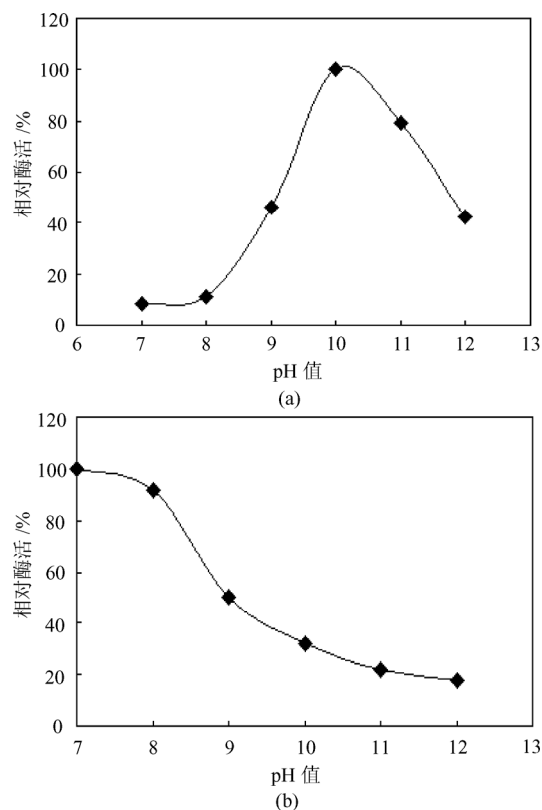


图 2 工程菌发酵产 PDOR 的最适反应 pH 值 (a) 与 pH 值稳定性 (b)

然后在 pH 值为 10.0 时测定酶活, 考察 PDOR 的 pH 值稳定性, 结果如图 2 (b) 所示, PDOR 在 pH 值 7.0~9.0 保持了较高的稳定性。

在只改变体系温度的条件下, 测定在 30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 等不同温度下的重组 PDOR 酶活力, 反应在 pH 值为 10.0、0.1 mol/L 的碳酸钾缓冲体系下进行, 以最大酶活为标准, 做出相对酶活力与反应温度曲线, 结果如图 3 (a) 所示。重组 PDOR 酶活力随温度升高逐渐增加, 约 55 °C 时, PDOR 酶活力最大。分别将酶液置于 30 °C、45 °C、55 °C、65 °C 等不同温度的水浴中保温, 在保温 30 min、90 min、150 min 时分别进行酶活力测定, 考察重组 PDOR 的热稳定性, 结果见图 3 (b), 可见 PDOR 在 30~45 °C 具有较好的热稳定性。

## 2.4 双酶偶联构建 1,3-PD 的酶催化耦合体系

实验在 pH 值为 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液试管体系中进行, 加入底物与双酶后加入辅酶  $\text{NAD}^+$  启动反应, 恒温轻微振荡, 每隔一定时间取样, 测定底产物 3-HPA, Gly 与产物 1,3-PD, DHA 的浓度变化, 得到主反应中 3-HPA 与 1,3-PD 随时间增长浓度变化曲线 [图 4 (a)] 及耦合反应中 Gly 与 DHA 随时间增长浓度变化曲线 [图 4 (b)]。

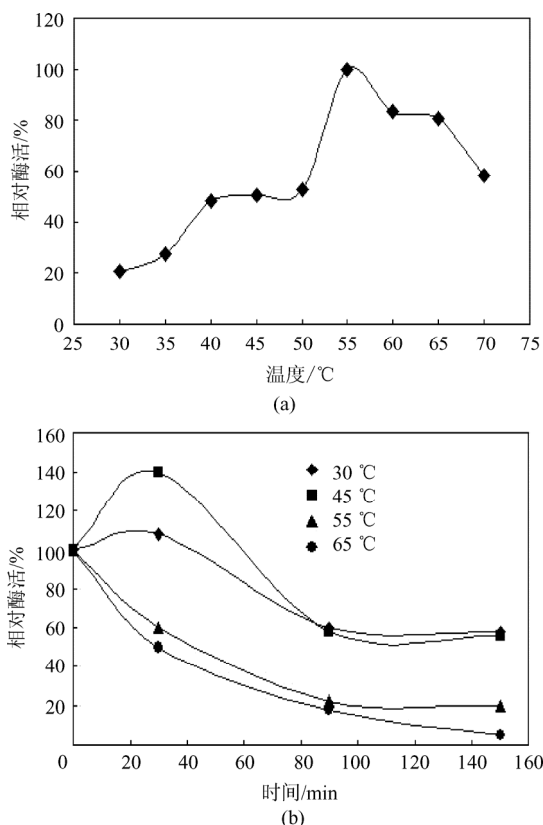


图 3 工程菌发酵产酶的最适反应温度 (a) 与温度稳定性 (b)

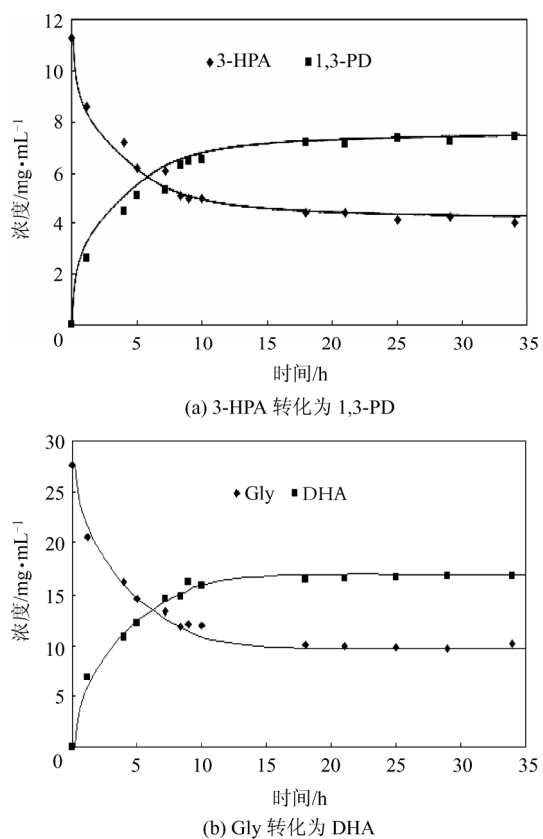


图 4 双酶催化耦合体系的底产物转化曲线

由图 4 (a) 可以看出, 随时间增加底物 3-HPA 逐渐消耗转化, 产物 1,3-PD 含量逐渐增加, 在 0~8 h 内耦合催化反应较显著, 1,3-PD 含量呈指数上升, 8 h 后偶联反应趋于平稳, 20 h 后反应基本达到平衡。图 4 (b) 中, 耦合反应中的底产物变化规律也基本相同。根据反应平衡时体系中底产物的含量计算可得主反应中产物 1,3-PD 的产率为 64.6%, 底物 3-HPA 转化率为 63.4%, 耦合反应中产物 DHA 产率为 60.7%, 底物 Gly 转化率为 63%。由实验结果可知, 在仅加入辅酶  $NAD^+$  后, 不同类型辅酶依赖型的双酶反应均得到了转化, 实现了批次伴有辅酶再生的耦合反应。

对比前期研究发现, 影响耦合酶反应效率的关键因素有酶活力大小及双酶酶学性质相适性等<sup>[6]</sup>。源于原始菌株 *Klebsiella pneumoniae* 的 PDOR 与 GDH 在酶活力与酶学性质等方面并不太相适: 初始 PDOR 和 GDH 最大酶活力仅有 18.7 U/mL 与 9.16 U/mL, PDOR 最适反应 pH 值为 9.5, pH 值稳定范围为 pH 值为 8.0~10.0, GDH 最适反应 pH 值为 11, pH 值稳定范围为 10~12, 两者催化温度稳定范围均在 30 °C 以下, 因此前期耦合体系的转化效率不太理想 (10~15%)<sup>[6]</sup>。在成功构建工程菌获得高活力的重组酶 PDOR (182 U/mL) 基础上发现其在酶学特性上与源于另一工程菌的重组酶 GDH (242 U/mL, 本实验室构建<sup>[9]</sup>) 较相适, 如两者的最适反应 pH 值相近 (10, 11), pH 值稳定范围也相近, 两者的最适反应温度也相近 (50 °C, 55 °C) 且反应温度稳定范围均提高到 30~45 °C, 这些因素均提高了双酶耦合的催化转化效率。

同时也发现批次耦合反应在 20 h 后基本处平衡状态, 底物的转化并不完全, 而且图 4 (b) 中底物 Gly 转化 DHA 并不十分充分, 这可能是由于反应一段时间后, 反应受到产物的部分交叉抑制作用<sup>[6]</sup>。进行产物的在线分离或构建新的耦合体系是解决产物抑制的有效方法, 同时进行催化剂、底物的循环利用实现多批次连续反应, 提高反应的最终效率以满足工业化生产要求。

### 3 结 论

利用定向进化改造后的 PDOR 表达基因成功构建了 PDOR 的表达工程菌, 经发酵获得高酶活的重组 PDOR 粗酶液。以自备的 3-HPA 和甘油为底物,

将 NADH 依赖型的重组 PDOR 催化 3-HPA 产 1,3-PD 反应与同样源于定向进化改造的高酶活 NAD<sup>+</sup>依赖型的重组 GDH 转化甘油反应相偶联,成功地构建了伴有辅酶再生的 1,3-PD 双酶耦合反应体系。由于产物抑制作用,耦合反应 20 h 后基本达到平衡,最终批次反应的 3-HPA 转化率达 63.4%,目标产物 1,3-PD 产率达 64.6%。

### 参 考 文 献

- [1] 孙晓冬, 吕伟峰, 宋志宾. 1,3-丙二醇的生产与应用[J]. 化学工程师, 2004, 12 (3): 21-22.
- [2] 瞿国华. PTT 的工业开发及 1,3-丙二醇的合成[J]. 中国精细化工, 2000, 23 (4): 31-34.
- [3] Saint-Amans S. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system[J]. *Biotechnol. Lett.*, 1994, 16 (10): 832-836.
- [4] Fabien B, El H H, Thierry C, et al. 1,3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries[J]. *Industrial Crops and Products*, 1998, 7(3): 281-289.
- [5] Biebl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial production of 1,3-propanediol [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52 (4): 289-297.
- [6] 陈宏文. 生物法合成 1,3-丙二醇的过程工程研究[D]. 天津: 天津大学, 2005.
- [7] 彭益强, 兰琳, 方柏山. 树脂分离技术在酶法制备 1,3-丙二醇中的应用[J]. 化工进展, 2008, 27 (7): 1129-1134.
- [8] ÁronNémeth, Béla Sevela. Development of a new bioprocess for production of 1,3-propanediol I: Modeling of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol with *Klebsiella pneumoniae* enzymes[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2008, 144: 47-58.
- [9] 罗菊香, 方柏山. 重组 1,3-丙二醇氧化还原酶酶学性质和稳定性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008 (10): 17-21.
- [10] 张婷婷, 方柏山, 王耿, 等. 克雷伯杆菌甘油脱氢酶基因的克隆表达与纯化[J]. 生物工程学报, 2008 (3): 495-499.
- [11] 彭益强, 颜天祝, 方柏山. 3-羟基丙醛耐菌的筛选与 3-羟基丙醛抑菌活力的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008 (1): 1-4.
- [12] 庄园. 1,3-丙二醇氧化还原酶的定向进化[D]. 泉州: 华侨大学, 2009.
- [13] van Loo B, Spelberg J H L, Kingma J, et al. Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling[J]. *Chemistry & Biology.*, 2004, 11 (7): 981-990.
- [14] Kweon D H, Han N S, Park K M, et al. Overproduction of phytolectin protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* [J]. *Process Biochem.*, 2001, 36 (6): 537-542.
- [15] Foor F, Morin N, Bostian K A. Production of L-dihydroxyphenylalanine in *E. coli* with the tyrosine phenol-lyase gene cloned from *Erwinia herbicola* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 3070-3075.
- [16] Hartsock C E, Lewis J K, Leslie I, et al. Assessing post-induction cellular response in a recombinant *E.coli* lactose-inducible system by monitoring beta-galactosidase levels [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1995, 17 (10): 1025-1030.
- [3] Cai R X, Hashimoto K, Kubota Y, et al. Increment of photocatalytic Killing of cancer cells using TiO<sub>2</sub> with the aid of superoxide dismutase[J]. *Chemistry Letters*, 1992, 3 (3): 427-430.
- [4] Wei C, Lin W Y, Zainal Z, et al. Bactericidal activity of TiO<sub>2</sub> photocatalyst in aqueous media: Toward a solar-assisted water disinfection system[J]. *Environ Science Technology*, 1994, 28 (5): 934-938.
- [5] Mills A, David R H, Worsley D, et al. Water purification by semiconductor photocatalysis[J]. *Chem. Sot. Rev.*, 1993, 23 (2): 417-425.
- [6] 于向阳, 程继建, 杜永娟. 二氧化钛光催化材料[J]. 化学世界, 2000 (11): 567-570.
- [7] 黄汉生. 日本 TiO<sub>2</sub> 光催化剂的应用进展[J]. 工业用水与废水, 2001, 32 (2): 55.
- [8] 毛日华, 郭存济. 液相反应制备纳米锐钛矿相二氧化钛[J]. 无机材料学报, 2000, 15 (4): 762-764.
- [9] Ranade M R, Navrotsky A, Zhang H Z, et al. Energetics of nanocrystalline TiO<sub>2</sub>[J]. *USA: Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99 (S2): 6476-6481.
- [10] Lopez T. FTIR and UV-V is spectroscopic characterization of TiO<sub>2</sub> sol-gel[J]. *Mater. Chem. & Phys.*, 1992, 32: 141-152.
- [11] Bacsá R R, Gratzel M. Rutile formation in hydrothermally crystallized nanosized titania [J]. *Journal of the American Ceramic Society*, 1996, 34: 290-293.
- [12] 张庆今, 胡晓红, 杨敏. 液相沉淀法制备 TiO<sub>2</sub> 超微粉末的影响因素分析[J]. 华南理工大学学报, 1996, 24 (7): 52-56.
- [13] 李谦, 祝迎春, 毛立群, 等. TiO<sub>2</sub> 纳米薄膜的微结构控制[J]. 无机材料学报, 2003, 18 (4): 951-954.
- [14] Doeuff S, Henry M, Sanchez C J. Hydrolysis of titanium alkoxides-modification of the molecular precursor by acetic-acid[J]. *Non-Cryst. Solids*, 1987, 89: 206-216.
- [15] 袁志好, 张立德. 掺锌的 TiO<sub>2</sub> 纳米粉的结构相变及发光性质[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20 (7): 1007-1011.

(上接第 2129 页)