

学校编码: 10384
学号: 20620081151614

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

甘油脱氢酶与辅酶 I 的共固定化研究
Co-immobilization of Glycerol dehydrogenase and
coenzyme I

钟和平

指导教师姓名: 方柏山教授

王世珍助理教授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2011 年 7 月

论文答辩日期: 2011 年 8 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 ()，在 2 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘要

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD/NADH 作为一类重要的辅酶，协助多种氧化还原酶催化细胞内包括糖酵解、细胞呼吸等途径的重要反应。NAD(H) 价格昂贵，易溶于水，不稳定，且回收难度大，成为限制氧化还原酶大规模工业化应用的“瓶颈”。本文尝试将共固定化技术与辅酶酶法再生结合，拓展氧化还原酶的工业应用。

本课题以辅酶和甘油脱氢酶（GDH）为研究对象，通过海藻酸修饰、环氧修饰、戊二醛交联、羰二亚胺活化等方法将辅酶固定在壳聚糖、纳米二氧化硅或碳纳米管载体上，选取较优载体及方法进行固定化条件优化；利用 NAD⁺与 GDH 的亲吸附，尝试 NAD⁺与 GDH 的共固定化，并对共固定化条件进行优化；探讨辅酶、甘油与甘油脱氢酶的作用机制，以其提出依赖辅酶的氧化还原酶催化底物的新机理。所研究的具体内容和得到的主要结果如下：

1. 考察壳聚糖、纳米二氧化硅、碳纳米管三种载体在不同修饰策略、不同初始辅酶浓度、pH、温度、离子浓度和混合程度下与辅酶固定化的效果。使用壳聚糖为载体，利用海藻酸修饰法，固定化辅酶的有效辅酶利用率达到 60%以上，高于使用碳纳米管为载体，利用羰二亚胺活化法固定化辅酶的有效辅酶利用率 40%；羰二亚胺活化碳纳米管对辅酶固定化量最大，使用 90 mg 载体对 22.5 μmol 辅酶进行固定化，对还原性辅酶 NADH 固定化量达到约 0.15 mg·mg⁻¹，对氧化性辅酶 NAD⁺ 的固定化量达到约 0.075 mg·mg⁻¹。

2. 进一步优化固定有辅酶 NAD⁺ 的壳聚糖、纳米二氧化硅、碳纳米管载体对甘油脱氢酶的亲和固定化条件。载有辅酶的碳纳米管、壳聚糖微球和纳米二氧化硅对 GDH 的固定化能力分别达到 0.4 g·g⁻¹、0.1 g·g⁻¹、0.24 mg·g⁻¹。以壳聚糖为载体，利用海藻酸修饰 NAD⁺ 法酶活力回收率达到 3.6%；以碳纳米管为载体，利用 EDAC 活化法酶活力回收率达到 2.3%；以纳米二氧化硅为载体，利用环氧修饰法，酶活力回收率仅为 0.28%；其中海藻酸修饰法有较好的应用前景。

3. 通过对固定化辅酶与 GDH 亲和结合催化底物甘油的静态反应过程中游离蛋白浓度的测定以及数据分析，提出 NAD⁺、甘油和 GDH 可能的催化反应新机理：在催化反应过程中，NAD⁺与 GDH 结合在一起，通过 H⁺ 的传递来实现氧

化还原反应；反应结束后，部分 NADH 不和 GDH 分离。经验证，反应结束后部分 GDH 仍然与辅酶结合，本论文提出的 H⁺ 质子传递机理能更好解释此试验现象。

关键词：甘油脱氢酶；NAD⁺；共固定化；酶法再生；催化机理

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Nicotinamide adenine dinucleotide, as an important class of coenzyme, plays an important role in variety of cellular oxidoreductase catalytic reaction, Including glycolysis, cellular respiration and other reaction pathways.

NAD(H) is expensive, easy to dissolve in water, leading to the difficulty of its recovery, which is the "bottleneck" factor of the large-scale industrial application with oxidoreductase. In this paper, we attempt to combine co-immobilization technology with coenzyme regeneration, for the expansion of industrial applications of oxidoreductase.

Taken glycerol dehydrogenase (GDH) as example, this paper uses chitosan, nano-silica and carbon nanotubes as non-water soluble carrier. Combined with alginate modification, epoxy modification, glutaraldehyde, carbonyl imine and other activation methods, coenzyme was immobilized and the immobilization conditions were optimized. It makes NAD⁺ and GDH Co-immobilization achieved with the absorption between NAD⁺ and GDH. Finally, the co-immobilization conditions and catalytic mechanism were investigated.

1. Chitosan, nano silica, carbon nanotubes as carrier were investigated in different initial coenzyme concentration, pH, temperature, ionic strength and stirring speed. The immobilization rate decreased gradually with glutaraldehyde, Activation of carbonyl diimine, alginate modification, epoxy modification; The residual activity rate of immobilized coenzyme with alginate modified is up to 60% , which is larger

than 40% with carbonyl diimine modified. The carbonyl diimine modified carbon nanotubes have the largest immobilized amount, which is about 0.15 mg/mg for NADH, 0.075 mg/mg for NAD⁺, respectively.

2. Further investigation was carried out about the immobilization condition with coenzyme NAD⁺ as the ligand of chitosan, nano silica and carbon nanotubes carrier. Optimal condition is obtained: the initial concentration of GDH enzyme protein is greater than 2.5 mgmL⁻¹, pH 9.0-11.0, low ionic strength, 25 °C, 200 rpm stirring 8 h or more. The amount of GDH enzyme immobilization using carbon nanotubes, chitosan microspheres and nano-silica with immobilized coenzyme decreases gradually, about 0.4 g/g, 0.1 g/g, 0.24 mg/g, respectively. Alginate modifying method and EDAC activation have greater binding amount of enzyme protein and higher enzyme activity recovery than epoxy method, which has 3.6%, 2.3% residual activity, respectively.

3. During the binding and catalytic reaction of NAD⁺ and GDH with substrate joined, the free enzyme protein concentration was periodically detected, while the catalytic mechanism is discussed through data analysis. The possible mechanism is proposed: during the catalytic reaction process, NAD⁺ and GDH are combined, the reaction is catalyzed through H⁺ transmission; partial GDH protein separate from NADH after reaction to form an adsorption equilibrium. To this end, column reaction experiments was designed to verify it.

Keywords : glycerol dehydrogenase ; NAD⁺ ; co-immobilization ; inducing conditions; catalytic mechanism

目 录

摘 要	I
Abstract	III
第一章 前言	1
1.1 辅酶 I 的概况.....	1
1.1.1 辅酶 I 的性质.....	1
1.1.2 辅酶的再生.....	3
1.2 甘油脱氢酶的概况.....	5
1.2.1 GDH 的分类及功能.....	5
1.2.2 GDH 的结构和应用.....	6
1.2.3 GDH 的纯化.....	6
1.3 辅酶与氧化还原酶共固定.....	7
1.3.1 辅酶固定化.....	8
1.3.2 NAD ⁺ 与 GDH 的亲和吸附.....	10
1.3.3 固定化的载体选择.....	11
1.4 GDH 和 NAD ⁺ 在催化反应中的作用机理.....	13
1.5 课题由来和主要内容.....	14
1.5.1 课题意义.....	14
1.5.2 主要研究内容.....	14
第二章 甘油脱氢酶的制备、纯化和酶活测定	16
2.1 实验材料和方法.....	16
2.1.1 菌株.....	16
2.1.2 实验试剂.....	16
2.1.3 主要仪器与设备.....	17
2.1.4 培养基.....	18
2.1.5 常用溶液及缓冲液配制方法.....	18
2.1.6 实验方法.....	20
2.2 结果与讨论.....	24
2.2.1 诱导剂的对酶活的影响.....	24
2.2.2 GDH 的纯化.....	25
2.3 小结.....	26
第三章 载体的制备与辅酶 I 的固定化	27
3.1 实验材料和方法.....	27
3.1.1 主要试剂.....	27
3.1.2 主要仪器与设备.....	27
3.1.3 常用溶液及缓冲液的配制方法.....	28
3.1.4 NAD ⁺ 及 NADH 标准曲线的制作.....	28
3.1.5 固定化 NAD ⁺ 及 NADH 有效辅酶利用率的测量.....	29
3.1.6 粗酶液的制备.....	30
3.1.7 Alg-NAD ⁺ 的制备.....	30
3.1.8 碳纳米管羧基含量测定.....	30
3.1.9 微珠壳聚糖活性载体的制备.....	31

3.1.10 纳米二氧化硅活性载体的制备	32
3.1.11 碳纳米管活性载体的制备	32
3.1.12 辅酶固定化及条件优化	32
3.2 结果与讨论	33
3.2.1 Alg-NAD ⁺ 修饰方法的可行性探究	33
3.2.2 载体固定化方法的选择	34
3.2.3 辅酶固定化条件的优化	36
3.3 小结	46
第四章 甘油脱氢酶与辅酶共固定化条件优化	48
4.1 实验材料和方法	48
4.1.1 实验试剂	48
4.1.2 主要仪器与设备	48
4.1.3 常用溶液及缓冲液的配制方法	49
4.1.4 DHA 和甘油含量的测定	49
4.1.5 含辅酶的载体对 GDH 酶蛋白的亲亲和固定化	51
4.2 结果与讨论	51
4.2.1 GDH 酶亲和固定化条件优化	51
4.2.2 固定化 GDH 酶温度稳定性考察	60
4.2.3 固定化酶的偶联反应	60
4.2.4 固定化酶活力回收率	62
4.3 小结	63
第五章 甘油脱氢酶催化甘油机理探讨	64
5.1 实验材料和方法	64
5.1.1 实验试剂	64
5.1.2 主要仪器与设备	65
5.1.3 常用溶液及缓冲液的配制方法	65
5.2 固定化辅酶对 GDH 的吸附	65
5.2.1 底物对 NAD ⁺ 与 GDH 结合的促进作用	65
5.2.2 基于间歇反应体系探讨依赖辅酶的 GDH 催化甘油的机理	66
5.2.3 基于连续反应体系探讨依赖辅酶的 GDH 催化甘油的机理	68
5.3 小结	70
第六章 结论与展望	71
6.1 总结	71
6.2 本课题的创新点	71
6.3 存在的问题与展望	72
参考文献	74
附录一 缩写词和英汉对照	81
在读期间发表论文	82
致谢语	83

CONTENTS

Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Overview of coenzyme I	1
1.1.1 Characteristics of coenzyme I	1
1.1.2 Regeneration of coenzyme I	3
1.2 Overview of glycerol dehydrogenase.....	5
1.2.1 Classification and function of GDH.....	5
1.2.2 Structure and application of GDH.....	6
1.2.3 Preparation and purification of GDH	6
1.3 Co-immobilization of Oxidoreductase and coenzyme I	7
1.3.1 Immobilization of coenzyme I	8
1.3.2 Affinity of NAD ⁺ and GDH	10
1.3.3 Selection of immobilization carriers.....	11
1.4 Mechanism of GDH and NAD ⁺ catalytic reactions.....	13
1.5 Purpose and main content	14
1.5.1 Purpose.....	14
1.5.2 Main content.....	14
Chapter 2 Preparation , purification and activity determination of glycerol dehydrogenase	16
2.1 Materials and methods	16
2.1.1 Microorganisms.....	16
2.1.2 Reagents	16
2.1.3 Instruments and equipments.....	17
2.1.4 Cultivation conditions	18
2.1.5 Buffer solution.....	18
2.1.6 Methods.....	20
2.2 Results and discussion.....	24
2.2.1 Standard curve of bovine serum albumin	24
2.2.2 Inducer of the enzyme	24
2.2.3 purification	25
2.3 Conclusions	26
Chapter 3 Preparation of carriers and immobilization of coenzyme I	27
3.1 Materials and methods	27
3.1.1 Reagents	27
3.1.2 Instruments and equipments.....	28
3.1.3 Buffer solution.....	28
3.1.4 Standard curve of NAD ⁺ and NADH	29
3.1.5 Coenzyme I activity determination of immobilized NAD ⁺ and NADH	30
3.1.6 Preparation of crude enzyme solution.....	30
3.1.7 Preparation of Alg-NAD ⁺	30
3.1.8 Determination of carboxyl content of carbon nanotubes	30

CONTENTS

3.1.9	Preparation of chitosan beads active carrier	31
3.1.10	Preparation of nano-silica active carrier	32
3.1.11	Preparation of carbon nanotube active carrier	32
3.1.12	Optimization of coenzyme immobilization	32
3.2	Results and discussion	33
3.2.1	Feasibility explore of Alg-NAD ⁺ Modified	33
3.2.2	Selection of immobilization methods	34
3.2.3	Optimization of NAD ⁺ and NADH immobilization	36
3.3	Conclusions	46
Chapter 4 Optimization of GDH and coenzyme Co-immobilization		48
4.1	Materials and methods	48
4.1.1	Reagents	48
4.1.2	Instruments and equipments	48
4.1.3	Buffer solution	49
4.1.4	Determination of DHA and glycerol	59
4.1.5	Co-immobilization	51
4.2	Results and discussion	51
4.2.1	Optimization of affinity-immobilization conditions	51
4.2.2	Thermal stability of the immobilized enzyme	60
4.2.3	Coupling reaction of the immobilized enzyme	60
4.2.4	Recovery of immobilized enzyme activity	62
4.3	Conclusions	63
Chapter 5 Study on the catalytic mechanism		64
5.1	Materials and methods	64
5.1.1	Reagents	64
5.1.2	Instruments and equipments	65
5.1.3	Buffer solution	65
5.2	Affinity adsorption of GDH on the immobilized coenzyme	65
5.2.1	Role of Substrate on GDH immobilization	65
5.2.2	Combination of immobilized coenzyme and GDH	66
5.2.3	Mechanism of reaction include GDH and coenzyme	68
5.3	Conclusions	70
Chapter 6 Conclusions and prospects		71
6.1	Conclusions	71
6.2	Innovations of this work	71
6.3	Problems and prospects	72
References		74
Appendix Abbreviations and english-chinese translation		81
Acknowledgements		83

第一章 前言

氧化还原酶（包括脱氢酶、氧化酶、过氧化酶和氧合酶等）是已知酶类中最大的一类，这类酶作为生物催化剂在生产有机酸、氨基酸、类固醇和手性药物，以及污染物降解、生物感应器制备中，发挥着重要作用^[1-3]。目前已有 EC 编号的不同种类的酶有5258种（截至2011-5-30），其中氧化还原酶比例约占29%^[4]，然而在进入工业应用的300多种酶中，氧化还原酶仅占2%左右。因此，充分挖掘并高效利用氧化还原酶是酶走向工业化的重要内容。

大多数氧化还原酶催化底物氧化或还原需要辅酶作为反应过程中氢或电子的传递体。辅酶 I [NAD(H)] 和辅酶 II [NADP(H)]是氧化还原酶最主要的辅酶。但是，辅酶价格昂贵，化学性质不稳定，反应之后不能自行再生是限制氧化还原酶大规模工业化应用的“瓶颈”因素。因此，反应体系中辅酶的截留及连续再生成了大规模开发和应用氧化还原酶的关键^[5]。

1.1 辅酶 I 的概况

辅酶是一类可以辅助酶蛋白催化反应的有机小分子^[6]，能与酶蛋白特异性结合，对特定酶的活性发挥是必要的。由于辅酶在酶催化反应中其化学组分发生了变化，因此可以认为辅酶是一种特殊的底物或者称为“第二底物”。

目前工业生产上应用的酶大多数是催化作用较简单，使用成本较低的水解酶，它在催化反应中不需要辅助因子参与，而在已被研究的酶中，约有 40%是需要辅酶参与的脱氢酶、磷酸转移酶和连接酶。已知有约七百种酶可以利用辅酶 I 进行催化^[7]。

1.1.1 辅酶 I 的性质

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, 简称为 NAD 或 NAD⁺)，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸由一分子烟酰胺核苷酸 (NMN) 和一分子腺嘌呤二核苷酸联结而成，是氧化还原酶的辅酶，在生物氧化还原系统中起着氢和电子传递作用，还原形式 NADH，因携带两个电子，也写为 NADHH，它出现在细胞

很多新陈代谢反应中。

NAD^+ 在氧化途径中是电子受体，而 NADH 在还原途径是电子供体。烟酰胺核苷酸(NMN)上吡啶环的 C-4 位置是辅酶 I 的反应中心（图 1-1），能接受或给出氢负离子，而分子中的腺嘌呤部分不直接参与氧化还原过程^[8]。氢负离子含两个电子，辅酶在脱氢酶反应起着转移氢负离子(即两个电子)的作用。

NAD^+ 辅助脱氢酶蛋白作用，如乙醇脱氢酶 (ADH)。它在糖酵解、糖异生、三羧酸循环和呼吸链中发挥着不可替代的作用。中间产物会将脱下的氢递给 NAD^+ ，使之成为 NADH 。

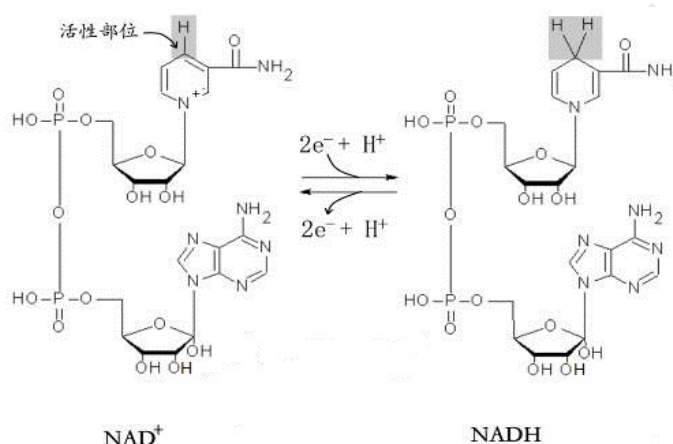


图 1-1 NAD^+ 与 NADH 的转化

Fig. 1-1 The transformation of NAD^+ and NADH

而 NADH 则会作为氢的载体，在呼吸链中通过化学渗透偶联的方式，合成 ATP。

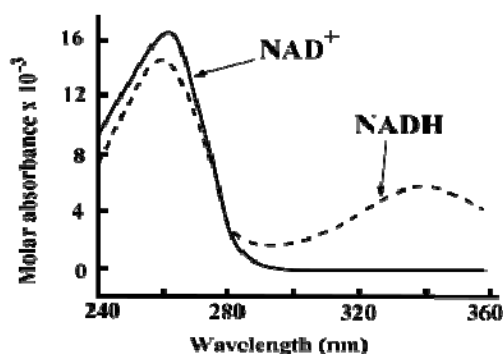


图 1-2 NAD^+ 和 NADH 的紫外吸光特征

Fig. 1-2 UV absorption of NAD^+ and NADH

在吸光方面, 由于腺嘌呤基团的存在, NAD(H) 都对紫外光有强烈吸收。如图 1-2, NADH 在 260 nm 和 340 nm 处各有一吸收峰, 而 NAD⁺ 则只有 260 nm 一处吸收峰, 这是区别两者的重要属性, 是测量它们代谢率的物理依据^[9]。NAD⁺ 在 260 nm 的吸光系数为 $1.78 \times 10 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$, 而 NADH 在 340nm 的吸光系数为 $6.2 \times 10 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$ 。

1.1.2 辅酶的再生

大部分氧化还原酶催化作用的发挥需要烟酰胺型辅酶 [NAD(P)⁺, NAD(P)H] 的参与, 它在酶促反应中与酶蛋白结合, 并作为氧化剂或还原剂直接参与反应。然而, NAD(P)⁺ 和 NAD(P)H 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是很有必要的。此外, 辅酶再生能够简化产物的分离, 并有利于酶促反应向正反应方向移动。

表征辅酶利用效果好坏的物理量是总转化数 (total turnover number, TTN), 其定义为每摩尔辅酶用于转化产生产物的总摩尔数, TTN反映了辅酶的循环效率。从经济角度考虑, 一个酶催化反应过程需要多少 TTN, 取决于产品的价格, 其范围是 10^2 - 10^5 之间^[3]。一般来说, 对于实验室规模要求 TTN 至少为 10^3 - 10^4 , 而对于工业化生产则需要达到 10^5 以上。提高 TTN, 需要有效地截留和连续再生辅酶。

由于辅酶的再生对于维持酶反应体系的稳定是必要的, 因此, 辅酶的保留和再生成为酶工程研究中的一个重要课题^[10]。2003 年连续两篇关于氧化还原辅酶再生的最新研究进展综述论文发表在《Current Opinion in Biotechnology》杂志上^[11,12], 表明辅酶再生已经受到极大重视。

近些年来, 为了解决辅酶 NAD⁺ 和 NADH 再生这一问题, 已经提出了一系列的方法, 包括化学法、光化学、酶法、电化学法、基因工程法等, 其中尤以酶法再生系统受到广泛重视。

化学法再生的主要缺点是缺乏特异性、辅酶容易被钝化、化学试剂污染产物使分离困难, 反应介质严重影响酶的稳定性, 已很少有人研究。

电化学法再生研究较广泛, 直接电解还原法再生效率低; 间接电解还原法需要甲基紫精 (Methyl viologen) 等电子介体参与。此法选择性差^[13], 辅因子易聚合,

电极远处的酶无法发挥催化活性，且跟某些酶促合成体系不能兼容。

光化学法再生辅酶廉价且洁净的光能，前景广阔，但通常需要光敏剂、电子媒介物、电子供体，至今效果不佳，体系复杂，再生效率低^[13]，仍处于试验阶段，近来报道较少。

现代基因工程技术可以通过导入特定外源酶基因，将所需的几种酶基因以适当比例重组，构建适合再生辅因子的新菌株。活细胞还可利用细胞原有酶系从廉价葡萄糖再生NADH。采用固定化重组基因工程菌株细胞或其粗提物将会使辅因子再生变得更加简便、有效^[14]。其应用难点在于酶的活性弱、产物和底物的扩散阻力大、细胞的生长抑制及对产物或底物的分解作用、产物的分离和纯化等^[15-17]。

1.1.2.1 酶法再生辅酶

在烟酰胺型辅酶的再生方法中，酶法再生选择性好，再生效率高。不同的酶或细胞参与的各个再生体系都有其优缺点，选择的标准基于酶或细胞的稳定性和活性、底物和产物对酶或细胞的影响程度。迄今为止，最成熟的是 Fomate/FDH 再生 NADH，它已达到工业技术水平，变异的 FDH 也能够有效地再生 NADPH。利用 NADH 氧化酶再生 NAD^+ 由于其操作简单、产物容易分离因而具有广阔的前景。

辅酶的酶法再生包括底物偶联法^[18]和酶偶联法^[19]（图 1-3）。对于底物偶联法，E1 和 E2 相同；对于酶偶联法，E1 不同于 E2。底物偶联法是在反应过程中添加辅助底物 (Substrate II)，在相同酶的催化下实现目标底物 (Substrate I) 和辅助底物 (Substrate II) 同时转化，但两者方向相反。酶偶联法是利用两个平行的氧化还原反应酶系统，一个酶催化底物转化，另一个酶则催化辅酶循环再生。酶偶联法再生效率高^[20]，为了达到最佳效果，两个酶的底物应相对独立，以避免两个底物竞争同一酶的活性中心。本课题使用的是酶偶联法使甘油脱氢酶和乳酸脱氢酶偶联。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫