

分散泛菌DJL-B醇脱氢酶的重组表达与固定化研究

田红, 庞立, 杨文韬, 陈晓, 王婧涵, 夏波, 蒋立文

Recombinant Expression and Immobilization of *Pantoea dispersa* DJL-B Alcohol Dehydrogenase

TIAN Hong, PANG Li, YANG Wentao, CHEN Xiao, WANG Jinghan, XIA Bo, and JIANG Liwen

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060040>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

不同诱导物对白地霉中高级醇脱氢酶的影响

Effects of Different Inducers on Higher Alcohol Dehydrogenase from *Galactomyces geotrichum*

食品工业科技. 2024, 45(6): 128-141 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040151>

来源于*P.bacterium* 1109的甘露醇脱氢酶的重组纯化及酶学性质研究

Purification and Characterization of Recombinant Mannitol Dehydrogenase from *P. bacterium* 1109

食品工业科技. 2020, 41(19): 137-143,165 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.022>

超滤膜分级玉米糖肽的抗氧化和乙醇脱氢酶激活活性

Antioxidant and Alcohol Dehydrogenase Activating Activities of Corn Glycopeptide by Ultrafiltration Membrane Classification

食品工业科技. 2022, 43(18): 29-35 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021090340>

两种甲醇脱氢酶在食甲基杆菌甲醇代谢中的作用

Role of Two Methanol Dehydrogenases in Methanol Metabolism of *Methylobacterium*

食品工业科技. 2024, 45(10): 126-132 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060130>

鼠李糖乳杆菌L-乳酸脱氢酶的生物信息学分析和基因克隆

Bioinformatics Analysis and Gene Cloning of L-Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus rhamnosus*

食品工业科技. 2023, 44(11): 153-162 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022080109>

基于分子动力学模拟研究温度对乳酸脱氢酶活性的影响

Investigation on the Effect of Temperature on the Activity of Lactate Dehydrogenase Based on Molecular Dynamics Simulation

食品工业科技. 2022, 43(1): 134-140 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010025>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

田红, 庞立, 杨文韬, 等. 分散泛菌 DJL-B 醇脱氢酶的重组表达与固定化研究 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 176–184. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060040

TIAN Hong, PANG Li, YANG Wentao, et al. Recombinant Expression and Immobilization of *Pantoea dispersa* DJL-B Alcohol Dehydrogenase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 176–184. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060040

· 生物工程 ·

分散泛菌 DJL-B 醇脱氢酶的重组表达 与固定化研究

田 红¹, 庞 立², 杨文韬¹, 陈 晓¹, 王婧涵¹, 夏 菲^{1,*}, 蒋立文^{1,*}

(1.湖南农业大学食品科学技术学院,湖南长沙 410128;

2.湖南农业大学园艺学院,湖南长沙 410128)

摘要:为了提高重组醇脱氢酶在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达水平, 本研究通过单因素实验探讨了诱导温度、诱导时间以及 IPTG 浓度对酶表达量的影响。并在此基础上, 进一步通过海藻酸钠包埋法研究了重组醇脱氢酶的固定化, 以提升其对香叶醇转化的应用价值。结果表明, 重组醇脱氢酶在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的最适表达条件为: 诱导温度 28 ℃, 诱导时间 20 h, IPTG 浓度 0.1 mmol/L。固定化的条件为: 固定化温度 20 ℃、海藻酸钠浓度 3.5%、加酶量 500 μL。同时固定化酶表现出良好的机械稳定性, 经重复使用 5 次后, 相对酶活性仍保持在 60% 左右, 显示出较好的重复使用性。研究结果为工业上利用固定化酶催化法制备香叶醛提供了重要的理论参考, 具有良好的应用前景。

关键词:醇脱氢酶, 异源表达, 固定化, 香叶醛, 生物转化

中图分类号:Q55 文献标识码:A 文章编号:1002-0306(2025)09-0176-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060040

本文网刊:



Recombinant Expression and Immobilization of *Pantoea dispersa* DJL-B Alcohol Dehydrogenase

TIAN Hong¹, PANG Li², YANG Wentao¹, CHEN Xiao¹, WANG Jinghan¹, XIA Bo^{1,*}, JIANG Liwen^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Horticulture College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To enhance the expression level of recombinant alcohol dehydrogenase in *E. coli* BL21 (DE3), this study investigated the effects of induction temperature, induction time, and IPTG concentration on enzyme expression through one-way experiments. Additionally, the immobilization of recombinant alcohol dehydrogenase using sodium alginate embedding was examined to improve its application in geraniol conversion. The results indicated that the optimal expression conditions for recombinant alcohol dehydrogenase in *E. coli* BL21 (DE3) were an induction temperature of 28 ℃, an induction time of 20 hours, and an IPTG concentration of 0.1 mmol/L. Furthermore, the conditions for immobilization were: immobilization temperature of 20 ℃, sodium alginate concentration of 3.5%, and enzyme addition of 500 μL. Meanwhile, the immobilized enzyme showed good mechanical stability, and the relative enzyme activity was still maintained at about 60% after 5 times of reuse, demonstrating good reusability. The results of the study provide an important theoretical reference for the industrial preparation of geraniol using immobilized enzyme catalysis, which has good application prospects.

Key words: alcohol dehydrogenase; heterogeneous expression; immobilization; geraniol; bio-transformation

收稿日期: 2024-06-06

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (2022JJ30299, 2022JJ30290)。

作者简介: 田红 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物转化, E-mail: 973539987@qq.com。

* 通信作者: 夏菲 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物转化与生物降解, E-mail: julinomber2@sina.com。

蒋立文 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术研究, E-mail: hnndjlw@163.com。

柠檬醛是一种重要的单萜, 广泛存在于诸多植物精油中^[1]。由于其自身特殊的香味, 被大量应用于化妆品、洗涤剂或是食品行业^[2]。研究表明, 柠檬醛赋予多种药用植物抗病毒特性, 而香叶醛是其主要组成成分之一, 占总柠檬醛含量的 60%~80% 左右, 发挥着主要作用^[3]。此外, 香叶醛还是工业合成薄荷醇、紫罗兰酮和维生素 A 的重要前体^[4~5]。传统的香叶醛制备方法主要依靠化学合成^[6], 成本高、能耗大。相较而言, 采用生物酶法合成香叶醛更具有绿色、高效且副产物少的优势。若能通过微生物酶法直接氧化香叶醇生成香叶醛, 将丰富的可再生原料转化为高经济价值的香料产品, 将具有极大的应用价值^[7~8]。在这方面, 醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenase, ADH, EC 1.1.1.1)是最具潜力的氧化还原酶类生物催化剂之一, 它能够催化醇与醛或酮之间的可逆氧化还原反应, 从而实现这一转化过程^[9]。例如, Iijima 等^[10]首次利用同位素分析研究了香叶醇的生物转化, 对生姜根茎中的香叶醇脱氢酶基因 *ZoGeDH* 进行了分子克隆, 以 NADP⁺为辅酶将香叶醇氧化为香叶醛, 显著增强了生姜的柠檬香气。Sato-Masumoto 等^[11]从紫苏中分离出香叶醇脱氢酶, 并建立了从香叶基二磷酸到香叶醛的生物合成途径。醇脱氢酶(ADH)是环烯萜生物合成路径中的关键酶基因^[12], 在辅酶 NAD⁺/NADP⁺的作用下, 可将香叶醇脱氢合成香叶醛。目前, 工业上的 ADH 主要来源于真菌及部分细菌^[13~16], 而细菌来源的 ADH 具有生产周期短、成本低及产率高的特点, 更受工业应用的青睐。此外, 重组酶的无活性问题仍然是限制其工业应用的重要因素。因此, 开发细菌来源的 ADH 并进行表达条件优化以获得大量重组酶具有重要的现实意义。

同时, 游离酶在催化过程中容易不稳定、降解失活且难以分离^[17], 限制了其在工业生产中的应用。因此, 固定化技术被常用于改良和优化酶, 以提升其性能和功能^[18~19]。固定化酶在同一催化反应中的重复使用以及通过从反应混合物中去除酶来快速终止反应等方面, 展现出了显著的优势^[20]。而海藻酸钠包埋法是最常用的酶固定化方法。海藻酸钠是一种从植物中提取的天然高分子材料, 与合成高分子材料相比, 具有更好的生物相容性, 并且其与钙离子的交联形成物理交联, 具有反应条件温和且反应速度快的特点^[21~22]。因此, 利用海藻酸钠包埋法对重组醇脱氢酶进行固定化, 这一策略不仅优化了酶的催化性能和重复使用性, 还能有效提高了香叶醛生产的经济效益。

本研究将含有 *ADHP* 基因的 pET-28a(+)质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达, 并优化了诱导温度、诱导时间和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside, IPTG)浓度, 以期提高大肠杆菌中重组 *ADHP* 蛋白的产量。

此外, 通过海藻酸钠包埋法对重组醇脱氢酶 *ADHP*(*Pantoea dispersa* Alcohol Dehydrogenase, *ADHP*)进行固定化, 研究固定化温度、海藻酸钠浓度、酶液加入量和反应时间对固定化酶相对酶活的影响。研究结果为实现固定化酶在工业生产香叶醛中的应用提供了重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

分散泛菌 DJL-B(*Pantoea dispersa* DJL-B) 本实验室 -80 ℃ 保存; 感受态大肠杆菌(DH5α 和 BL21)、IPTG(50 mg/mL)、氨苄青霉素(50 μg/mL)、卡那霉素硫酸盐(10 mg/mL)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司; pET-28a(+)、pGEM-T 质粒 武汉森灵生物科技有限公司; 限制性内切酶 *Not* I (10 U/μL)、*Eco* RI (15 U/μL) 北京宝日医生物科技有限公司; T4 DNA 连接酶(25000 U)、His 标签纯化试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司; 香叶醇、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD⁺)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen, NADH)、海藻酸钠、氯化钙 上海麦克林生化科技有限公司; 其他试剂均为分析级。

T100TMPCR 扩增仪 美国伯乐 Bio-Rad 公司; Bio-Photometer 紫外可见光分光光度计 上海艾本德国际贸易有限公司; DUT-486 蓝光显色仪 上海巴玖实业有限公司; JY96-IIIN 超声破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司; ZNCL-B 智能磁力搅拌器 河南佰年仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 通过细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分散泛菌 DJL-B 的全基因组 DNA, 再根据 GenBank 检索得到分散泛菌 DJL-B 的 1 号染色体(GenBank: CP082346.1)上 *ADHP* 基因的完整序列, 设计引物 F1: 5'-CGGAATTCTATGCAAATCAAAA-CCACCATGAAAGC-3'; R1: 5'-TAAAGCGGCC-GCCTACAGCGACATATCCACCACAAT-3', 产物长度为 1035 bp, 下划线为 *Eco* R I 和 *Not* I 的酶切位点。

1.2.2 pGEM-T-ADHP 质粒的构建 以获取的分散泛菌 DJL-B 的 DNA 作为模板, F1/R1 为特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为: DNA 模板 1 μg, F1/R1(10 μmol/L)各 0.5 μL, 2xTaq PCR Master Mix II(终浓度 1x)10 μL, 最后添加 ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应条件为: 94 ℃ 3 min、94 ℃ 30 s、70 ℃ 30 s、72 ℃ 60 s, 30 次循环; 72 ℃ 5 min。使用凝胶回收试剂盒进行切胶回收, 得到纯化后的基因片段, 将其命名为 *ADHP*, 并通过 T4 DNA 连接酶与 pGEM-T 于 16 ℃ 过夜连接。酶连产物 pGEM-

T-ADHP 置于 42 ℃ 热激 70 s 转化至 *E. coli* DH5 α , 将菌液涂布于含氨苄青霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、IPTG(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、X-Gal(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 固体培养基中。挑取白色阳性克隆菌落送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.2.3 pET-28a(+) -ADHP 表达载体的构建 使用 *Eco* RI 和 *Not* I 两种限制性内切酶将 pGEM-T-ADHP 和 pET-28a(+) 质粒分别于 37 ℃ 进行 8 h 酶切。切胶回收 1035 bp 处的 ADHP 目的基因和 5400 bp 处的 pET-28a(+) 表达载体, 并用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 从而构建 pET-28a(+)-ADHP 重组表达载体。将连接产物热激至 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌株中, 涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素抗性的 LB 平板上。挑取阳性菌落送往上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

1.2.4 重组 ADHP 酶粗酶液的获取与蛋白纯化 吸取 10 mL 的 *E. coli* BL21(DE3) 含 pET-28a(+) -ADHP 质粒的菌液于 6000 r/min 4 ℃ 离心 10 min, 收集菌体。加入 10 mL 的细菌蛋白制备裂解液, 冰浴条件下超声波破碎 20 min(250 W, 工作 2 s, 间隙 6 s)。将裂解液于 4 ℃ 12000 r/min 离心 20 min, 收集的上清液即为可溶性蛋白并用于蛋白纯化。粗酶液采用 His 标签纯化试剂盒进行, 取 4 mL ADHP 破碎粗酶液, 加入已平衡的 50% BeyoGold™ His-tag 纯化树脂, 混匀后在冰浴环境下放入脱色摇床中缓慢以 100 r/min 摆动 60 min, 使 His 标签重组蛋白与 5 mL 的镍柱充分结合。用非变性洗脱液洗柱 5 次, 并收集洗脱液至离心管中, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 观察洗脱蛋白的分子质量大小和纯度, 其中分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 4%^[23]。

1.2.5 重组 ADHP 酶的诱导表达及条件优化

1.2.5.1 诱导温度对重组 ADHP 酶表达量的影响 在 20 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中培养重组菌株至 OD₆₀₀ 约 0.5~0.6, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 16、28、37、42 ℃ 以 100 r/min 分别诱导 20 h, 取 10 μL 菌液进行 SDS-PAGE 电泳检测。使用 ImageJ 软件计算其灰度值并对目标区域内信号强度的定量评估^[24~25]。

1.2.5.2 诱导时间对重组 ADHP 酶表达量的影响 在 20 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中培养重组菌株至 OD₆₀₀ 约 0.5~0.6, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 28 ℃ 转速 100 r/min 分别诱导 4、8、12、16、20、24 h, 取 10 μL 菌液进行 SDS-PAGE 电泳检测。使用 ImageJ 软件计算其灰度值并对目标区域内信号强度的定量评估。

1.2.5.3 IPTG 浓度对重组 ADHP 酶表达量的影响 在 20 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中培养重组菌

株至 OD₆₀₀ 约 0.5~0.6, 加入终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mmol/L 的 IPTG 于 28 ℃ 100 r/min 诱导 20 h, 取 10 μL 菌液进行 SDS-PAGE 电泳检测。使用 ImageJ 软件计算其灰度值并对目标区域内信号强度的定量评估。

1.2.6 重组 ADHP 酶活性检测及 NADH 生成量的测定

1.2.6.1 酶活力测定 根据 340 nm 处 NADH 吸光度的变化进行测定 ADHP 重组酶活力^[26]。反应混合物由 160 μL 甘氨酸缓冲液(pH10, 50 mmol/L)、1 g/L 的香叶醇加 5% 吐温 20 溶解和 1 mmol/L NAD⁺ 以及 20 μL 的酶溶液组成^[27]。1 单位 ADH 活性定义为在上述条件下, 每 10 min 生成 1 μmol NADH 所需的 ADH 量。相对酶活力(%)=游离酶活力/相对条件下游离酶活力最大值×100。

1.2.6.2 NADH 生成量的测定 取 76.34 mg 的 NADH 标准品用 10 mL 的超纯水溶解, 配制成 10 mmol/L 的母液。依次将母液稀释配制成 1、2、5、8、10 mmol/L 浓度的子液, 用紫外分光光度计测定每个标准溶液在 340 nm 波长下的吸光度, 使用线性回归方法绘制拟合线, 再将 1.2.6.1 样品在反应时间为 10、20、30、40、50、60 min 时的吸光度带入标准曲线方程中, 以确定 NADH 的生成量。

1.2.7 重组 ADHP 酶酶动力学研究 在 1.2.6.1 的反应体系下, 保持香叶醇及酶浓度不变的条件下, 以 0.2、0.5、0.8、1、1.5、2 mmol/L 浓度的 NAD⁺ 进行酶学动力学分析^[28], 研究辅酶 NAD⁺ 浓度对酶促反应的影响。使用 GraphPad Prism 9.0 对所获数据进行非线性拟合回归, 根据米氏方程(Michaelis-Menten Equation)得 K_m 和 V_{max}。

1.2.8 重组 ADHP 酶的固定化及条件优化

1.2.8.1 温度对酶固定化过程中凝胶小球形态的影响 配制 3.5% 的海藻酸钠溶液, 加热至 50~60 ℃ 以确保完全溶解。冷却至室温后, 加入 500 μL 重组 ADHP 酶液。将混合液用 5 mL 注射器滴加到已配制好的 5 mL 2% 壳聚糖溶液和 1 mL 2% 氯化钙混合溶液中, 然后在不同的温度 10、20、30、40、50 ℃ 下, 使用磁力搅拌器形成凝胶小球, 将凝胶小球在氯化钙溶液中静置 30 min 以进行固化。固化后, 使用超纯水多次洗涤凝胶小球, 去除表面的氯化钙溶液, 于 4 ℃ 条件下保存备用^[29]。并观察温度对凝胶小球的形态的影响。

1.2.8.2 海藻酸钠浓度对固定化醇脱氢酶酶活的影响 配制 0.7%、1.4%、2.1%、2.8%、3.5%、4.2% 的海藻酸钠溶液, 加热至 50~60 ℃ 以确保完全溶解。冷却至室温后, 加入 500 μL 重组 ADHP 酶液。将混合液用 5 mL 注射器滴加到已配制好的 5 mL 2% 壳聚糖溶液和 1 mL 2% 氯化钙混合溶液中, 在 20 ℃ 下, 使用磁力搅拌器形成凝胶小球, 将凝胶小球在氯

化钙溶液中静置 30 min 以进行固化。固化后, 使用超纯水多次洗涤凝胶小球, 去除表面的氯化钙溶液, 于 4 ℃ 条件下保存备用。并于 OD₃₄₀ 处测定固定化酶反应 40 min 后的相对酶活。

1.2.8.3 酶量对固定化醇脱氢酶酶活的影响 配制 3.5% 的海藻酸钠溶液, 加热至 50~60 ℃ 以确保完全溶解。冷却至室温后, 加入 10、50、150、200、500、800 μL 重组 ADHP 酶液。将混合液用 5 mL 注射器滴加到已配制好的 5 mL 2% 壳聚糖溶液和 1 mL 2% 氯化钙混合溶液中, 在 20 ℃ 下, 使用磁力搅拌器形成凝胶小球, 将凝胶小球在氯化钙溶液中静置 30 min 以进行固化。固化后, 使用超纯水多次洗涤凝胶小球, 去除表面的氯化钙溶液, 于 4 ℃ 条件下保存备用。并于 OD₃₄₀ 处测定固定化酶反应 40 min 后的相对酶活。

1.2.8.4 最适条件下固定化醇脱氢酶的反应速率

配制 3.5% 的海藻酸钠溶液, 加热至 50~60 ℃ 以确保完全溶解。冷却至室温后, 加入 500 μL 重组 ADHP 酶液。将混合液用 5 mL 注射器滴加到已配制好的 5 mL 2% 壳聚糖溶液和 1 mL 2% 氯化钙混合溶液中, 在 20 ℃ 下, 使用磁力搅拌器形成凝胶小球, 将凝胶小球在氯化钙溶液中静置 30 min 以进行固化。固化后, 使用超纯水多次洗涤凝胶小球, 去除表面的氯化钙溶液, 于 4 ℃ 条件下保存备用。并参考 1.2.6.2 于 OD₃₄₀ 处测定固定化酶反应 10、20、30、40、50、60 min 时 NADH 的生成量。

1.2.8.5 固定化酶活力的计算 参考 1.2.6.1 测定固定化酶的酶活力, 加入 0.2 g 固定化酶进行反应, 相对酶活力(%)=固定化酶活性/相对条件下固定化酶活力最大值×100。

1.2.8.6 固定化酶的重复使用性 取 0.2 g 固定化 ADHP 酶凝胶小球加入 1.2.6.1 的反应体系中, 每次反应后, 过滤凝胶小球并用超纯水洗涤 3 次, 以清除表面残余物。待表面水分干燥后, 再次将凝胶小球加入新的底物反应体系中, 即为第二次重复使用。第一次循环的酶活力设定为 100%。

1.3 数据处理

所有实验均重复进行三次, 以确保结果的可靠性和可重复性。实验数据通过使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行详细的统计学分析, 并可视化数据结果。

2 结果与分析

2.1 ADHP 基因的扩增及克隆和表达载体的构建

PCR 扩增所得的 ADHP 基因产物经过琼脂糖凝胶电泳检测, 参见图 1。电泳结果显示在 1035 bp 位置出现一条清晰的条带, 与预期大小一致。将 ADHP 基因进行切胶回收后, 通过连接反应构建了 pGEM-T-ADHP 克隆载体, 并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。选择白色阳性克隆菌株提取质粒, 并

进行双酶切分析, 如图 2a 所示, 1 池道中有两个条带, 并且其大小与预期的片段一致, 这表明质粒被正确切开, 并包含预期的插入片段。测序结果确认了重组 pGEM-T-ADHP 载体的正确构建。随后, 将酶切后的克隆载体产物进行切胶回收, 并通过连接反应转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中。由上海生工生物工程股份有限公司进行测序, 结果表明成功构建了 pET-28a(+)-ADHP 表达载体。经双酶切分析, 图 2b 显示了成功构建的表达质粒 pET-28a(+)-ADHP 的结果, 在 1035 bp 处出现了目的条带。

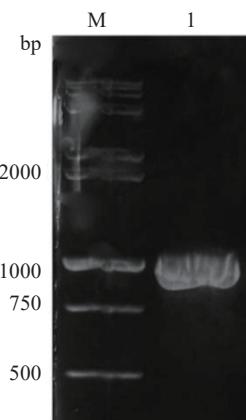


图 1 ADHP 基因 PCR 扩增结果的琼脂糖凝胶电泳图
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification results of ADHP gene

注: M: Marker; 1: ADHP 基因扩增结果。

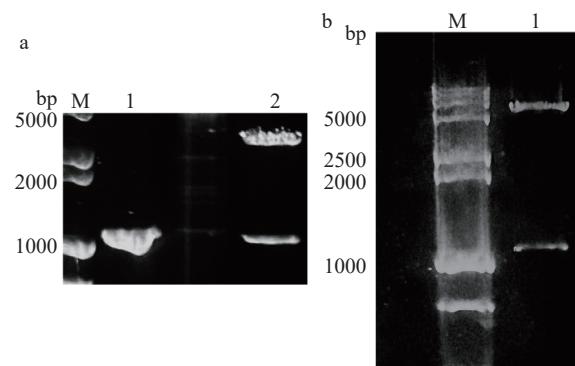


图 2 pGEM-T-ADHP 克隆质粒(a)及 pET-28a(+)-ADHP 表达质粒双酶切结果(b)的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of pGEM-T-ADHP cloning plasmid (a) and double digestion results of pET-28a(+)-ADHP expression plasmid (b)

注: (a) M: Marker, 1: ADHP 基因条带位置, 2: pGEM-T-ADHP 克隆质粒双酶切结果; (b) M: Marker; 1: pET-28a(+)-ADHP 克隆质粒双酶切结果。

2.2 重组酶的诱导表达及分离纯化

重组 ADHP 酶编码 345 个氨基酸, 分子质量约为 36.5 kDa。SDS-PAGE 分析的粗酶液结果如图 3a 所示, 在 36 kDa 处出现了特征条带, 这与预期设计的蛋白分子质量一致。而且在诱导表达前无 ADHP 相对应的条带, 并在诱导后的上清液中观察到目标蛋白的条带, 表明重组工程菌成功可溶性表达了醇脱氢酶。

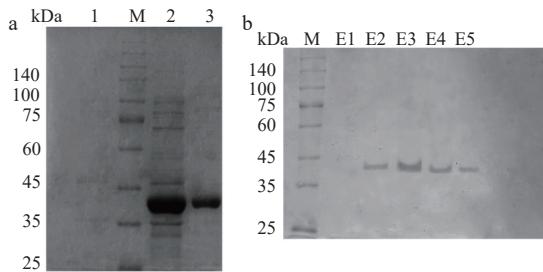


图3 pET-28a(+) -ADHP 在大肠杆菌 BL21(DE3)的诱导表达后(a)和 His 标签纯化后(b)的重组 ADHP 酶液的 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE plots of recombinant ADHP enzyme solution after induced expression of pET-28a(+) -ADHP in *E. coli* BL21 (DE3) (a) and after His-tag purification (b)

注: (a) M: Marker, 1: IPTG 诱导前蛋白, 2: IPTG 诱导后总蛋白, 3: IPTG 诱导后破碎上清液; (b) M: Marker, E1~E5: 含目的蛋白的洗脱液。

为了进一步纯化重组表达带有 His 标签 ADHP 醇脱氢酶蛋白, 采用了镍柱亲和层析的方法。该方法基于 His 标签与镍离子之间的强亲和力, 通过镍柱可以特异性纯化目标蛋白。收集的各组分洗涤液和洗脱液通过 SDS-PAGE 电泳分析, 以检测 His 标签重组蛋白的纯化效果。根据电泳结果, 选择含有目标蛋白的洗脱液进行储存, 结果如图 3b 所示, 第三次洗脱的蛋白含量最高。

2.3 重组 ADHP 酶诱导表达条件的优化

2.3.1 诱导温度对重组 ADHP 酶表达量的影响 如图 4 所示, 合适的诱导温度有助于蛋白的折叠和翻译从而增加蛋白的表达量^[30]。高温下蛋白质的合成速度可能超过其正确折叠的速度, 导致产生大量无活性的蛋白质或包含错误折叠的聚集体; 而低温下蛋白质的折叠速度可能减慢, 导致蛋白质在细胞中滞留时间过长, 从而被降解^[31]。通过 ImageJ 软件对灰度值进行分析, 灰度值越高意味着诱导表达的蛋白量增加。结果显示, 随着温度的增高, 蛋白的表达量先增加后减少。在诱导温度为 28 ℃ 条件下, 重组 ADHP 蛋白的表达量最高且灰度值也最高(表 1), 因此在后

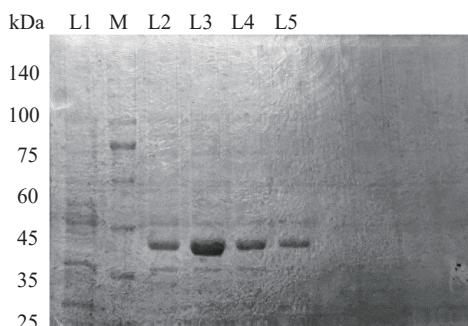


图4 不同诱导温度对蛋白表达量的影响

Fig.4 Effect of different induction temperatures on protein expressions

注: M: Marker; L1: IPTG 诱导前蛋白; L2~L5: 16、28、37、42 ℃ 条件下重组 ADHP 蛋白表达量。

续研究中选择 28 ℃ 作为最适诱导温度。

表1 ImageJ 灰度分析不同诱导温度下 SDS-PAGE 电泳结果
Table 1 ImageJ grey scale analysis of SDS-PAGE electrophoresis results at different induction temperatures

诱导温度(℃)	区域	区域内灰度平均值	最大灰度	校正后的像素总和
16	1456	23.456	59	33542
28	1456	47.178	80	67465
37	1456	24.546	62	35101
42	1456	19.257	55	27538

2.3.2 诱导时间对重组 ADHP 酶表达量的影响 如图 5 所示, 诱导时间的合理选择对于最大化目标蛋白的表达量至关重要。若诱导时间不足, 目标蛋白表达不充分; 反之, 若诱导时间过长, 则可能导致目标蛋白的降解或失活^[32]。此外, 系统在诱导过程中, 宿主细胞的新陈代谢负担增加, 可能导致其生长速率下降, 因此需要选定较短的诱导时间^[33]。经 SDS-PAGE 检测, 观察不同诱导时间对表达量的影响, 可以确定最佳诱导时间。根据表 2 的灰度值分析结果, 在 20 h 条件下, 灰度值最大, 且诱导表达的蛋白量明显升高。因此, 最佳诱导时间为 20 h。

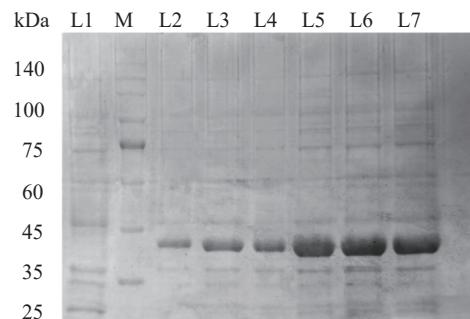


图5 不同诱导时间对蛋白表达量的影响

Fig.5 Effects of different induction times on protein expression

注: M: Marker; L1: IPTG 诱导前蛋白; L2~L7: 4、8、12、16、20、24 h 时间条件下重组 ADHP 蛋白表达量。

表2 ImageJ 灰度分析不同诱导时间下 SDS-PAGE 电泳结果

Table 2 ImageJ grey scale analysis of SDS-PAGE electrophoresis results at different induction times

诱导时间(h)	区域	区域内灰度平均值	最大灰度	校正后的像素总和
4	4176	19.745	71	66343
8	4176	38.827	67	130460
12	4176	22.779	55	76538
16	4176	44.489	67	149483
20	4176	50.633	81	170127
24	4176	42.383	65	142408

2.3.3 IPTG 浓度对重组 ADHP 酶表达量的影响

如图 6 和表 3 所示, IPTG 的添加浓度对 *E. coli* BL21(DE3) 中 ADHP 蛋白的表达无明显的影响。但考虑 IPTG 具有一定的细胞毒性^[34~35], 为降低成本并减少细胞毒性影响, IPTG 的最终浓度优选为 0.1 mmol/L。

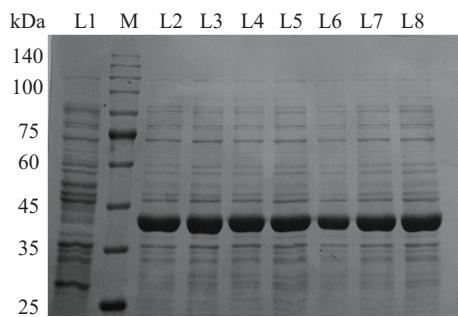


图 6 不同浓度 IPTG 对蛋白表达量的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of IPTG on protein expressions

注: M: Marker; L1: IPTG 诱导前蛋白; L2~L8: 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mmol/L 浓度下重组 ADHP 酶蛋白表达量。

表 3 ImageJ 灰度分析不同 IPTG 诱导浓度下 SDS-PAGE 电泳结果

Table 3 ImageJ grey scale analysis of SDS-PAGE electrophoresis results at different IPTG-induced concentrations

IPTG浓度 (mmol/L)	区域	区域内灰度平均值	最大灰度	校正后的像素总和
0.05	4576	49.096	77	224662
0.1	4576	49.232	79	225285
0.2	4576	47.131	79	215673
0.4	4576	51.001	81	233381
0.6	4576	38.445	81	175926
0.8	4576	52.776	86	241505
1	4576	56.456	85	258342

2.3.4 重组 ADHP 酶的酶动力学研究 如图 7 所示, 在 1.2.6 的反应体系下, 反应进行 60 min 后, NADH 的生成量约为 0.7 mmol/L, 转化效率在 70% 左右,

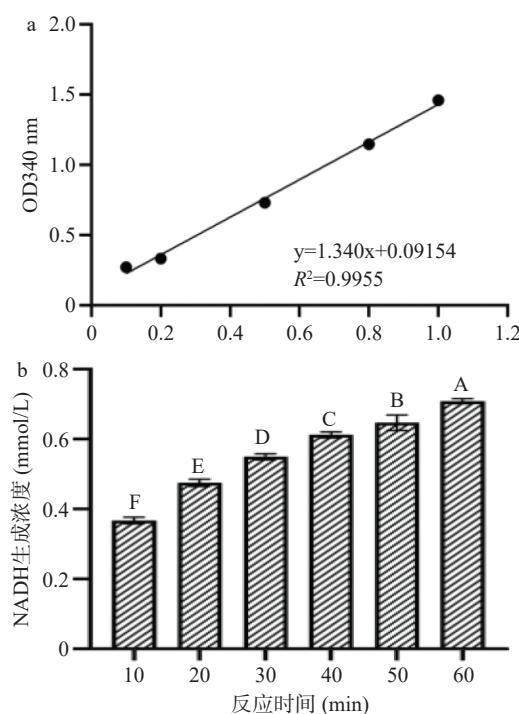
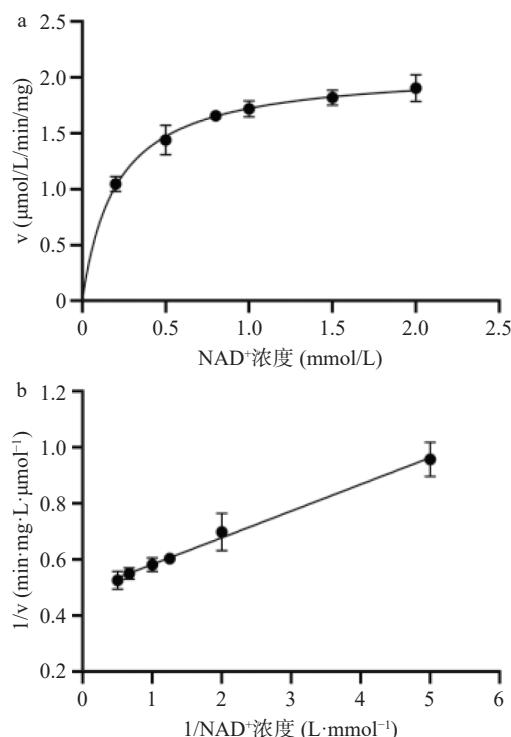


图 7 NADH 标曲(a)和随着反应的进行 NADH 生成量(b)

Fig.7 NADH calibration curve (a) and NADH production as the reaction proceeds (b)

注: 不同大写字母表示组间差异显著($P<0.05$), 图 10~图 13 同。

说明表达的 ADHP 酶具有较高的催化活性。接着, 在 0~2 mmol/L 范围内测定辅酶 NAD⁺的初始酶反应速率。通过将辅酶浓度作为 X 轴, 反应速度 v 作为 Y 轴进行曲线拟合, 结果如图 8 所示。根据米氏方程, 重组 ADHP 酶的特征性常数 K_m 值为 0.2058, V_{max} 值为 2.078 μmol/L/min/mg。 K_m 值越小, 表明酶对底物的亲和力越大, 即在较低的底物浓度下酶也能达到较高的反应速度^[36]。

图 8 辅酶 NAD⁺与重组 ADHP 酶的非线性拟合方程(a)和双倒数图(b)Fig.8 Non-linear fitting equations (a) and double inverse plots (b) of coenzyme NAD⁺ with recombinant ADHP enzyme

2.4 重组 ADHP 酶的固定化

2.4.1 温度对酶固定化过程中凝胶小球形态的影响

在酶的固定化过程中, 温度是一个关键因素, 会影响到溶液的粘度、酶的溶解度以及海藻酸钠小球的稳定性。在海藻酸钠浓度为 3.5%, 加酶量为 500 μL 的条件下, 不同固定化温度的所制备的凝胶小球结果如图 9 所示。在高温条件(40 °C 和 50 °C)

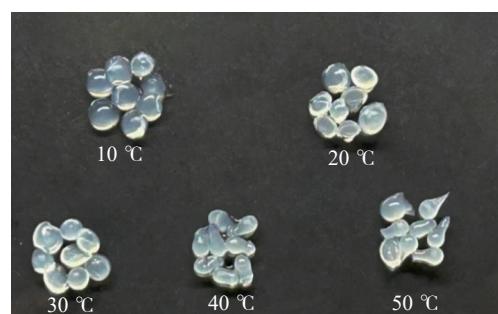


图 9 固定化温度对凝胶小球形态的影响

Fig.9 Effect of immobilization temperature on the morphology of gel pellets

下,小球的成球率较低,容易出现拖尾和团聚现象;而在低温条件(10°C)下,微球表面形成的固定化膜强度不足,导致微球容易分散,机械强度较差,凝胶珠脆弱,易破裂。所以选择中等温度范围(20°C 至 30°C),后续在 20°C 的温度下进行固定化操作。

2.4.2 海藻酸钠浓度对固定化醇脱氢酶相对酶活的影响 如图10所示,海藻酸钠浓度以0.7%的梯度递增时,重组ADHP酶的相对酶活先升高再降低,在3.5%浓度时固定化酶的相对酶活达到最值。在较低浓度的海藻酸钠浓度(<2.1%)下形成的凝胶小球,机械强度较低,容易破碎,不足以有效包埋酶分子,导致酶流失或失活;而在较高浓度的海藻酸钠浓度(>2.8%)使用过程中保持了凝胶小球的整体性,减少破碎和损失;高浓度的海藻酸钠(>4.2%)形成的凝胶孔径较小,导致底物和产物的传质速率降低,影响酶的反应效率,从而导致相对酶活的降低^[37]。

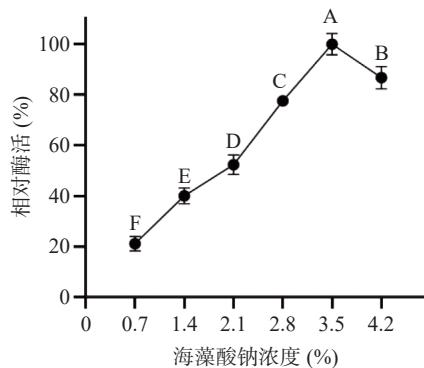


图10 海藻酸钠浓度对固定化效果的影响

Fig.10 Effect of sodium alginate concentration on the immobilization effect

2.4.3 酶量对固定化醇脱氢酶相对酶活的影响 如图11所示,随着固定化过程中所加入酶量的增加,凝胶小球的相对酶活性也逐渐增加。当加酶量达到500 μL 时,海藻酸钠凝胶小球的吸附能力达到饱和。同时为了节省酶液材料成本,选择500 μL 进行包埋应用。通过增加酶量,酶分子可以更加充分地被海藻酸钠凝胶小球吸附,从而提升整体酶活性。

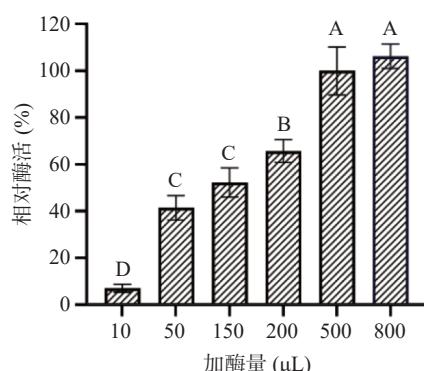


图11 加酶量对固定化醇脱氢酶相对酶活的影响

Fig.11 Effect of enzyme addition on the relative enzyme activity of immobilized alcohol dehydrogenases

2.4.4 最适条件下固定化醇脱氢酶的反应速率

图12反映了最适条件下反应体系中NADH的生成量随反应时间的变化。反应进行到40 min时达到了最大值,生成了0.98 mmol/L的NADH,表明,在固定化酶的作用下,底物可以高效转化为产物,酶的催化性能得到了充分发挥。

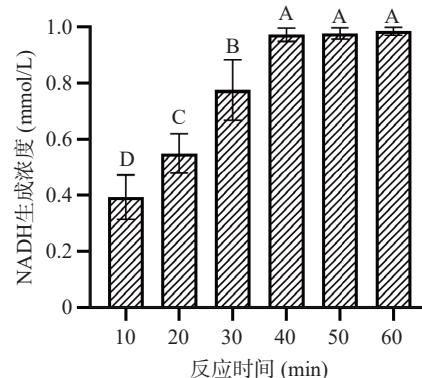


图12 反应时间对固定化酶反应速率的影响

Fig.12 Effect of reaction time on the reaction rate of immobilized enzymes

2.4.5 固定化酶重复使用性 如图13所示,随着操作次数的增加,固定化酶的相对酶活性缓慢下降。在第5次仅剩60%的相对酶活,而在第8次重复操作后,固定化酶的相对酶活降低至20%,推测是由于循环操作的次数增加,使得凝胶颗粒的强度减弱,造成酶的流失,导致酶活力下降,表明其机械操作稳定性有待进一步提高^[38]。

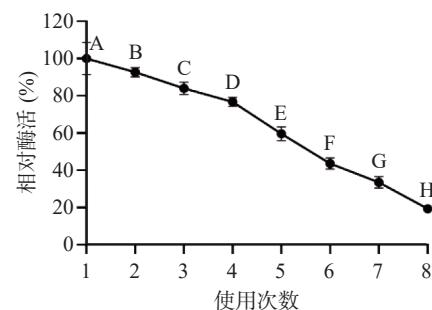


图13 固定化酶的使用次数稳定性

Fig.13 Stability of immobilized enzymes in terms of number of uses

3 结论

香叶醛在香料工业、医药工业及有机合成领域都具有广泛的应用价值;本研究成功构建了含有醇脱氢基因的表达载体,并在大肠杆菌BL21(DE3)中实现可溶表达。经过单因素实验分析,确定了在诱导温度为 28°C 、诱导时间为20 h以及IPTG浓度为0.1 mmol/L的条件下,醇脱氢酶的蛋白表达量最高。同时,通过海藻酸钠包埋法实现了酶的固定化,所采用的固定化载体价格低廉,固定化方法简易有效,其固定化条件为:固定化温度 20°C ,海藻酸钠浓度3.5%,反应时间40 min。在上述条件下,对固定

化酶进行重复使用实验,结果显示在使用 5 次后酶活性仍在 60% 左右,表明固定化酶具有较好的重复操作稳定性,但进一步提高其稳定性仍需更多研究。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] KING A, RICHARD D J. Biotransformation of monoterpenic alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*[J]. *Yeast*, 2000, 16(6): 499–506.
- [2] TAN C S, HASSAN M, MOHAMED H Z A, et al. Structural and kinetic studies of a novel nerol dehydrogenase from *Persicaria minor*, a nerol-specific enzyme for citral biosynthesis[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 123: 359–368.
- [3] ANDRADE M A, das GRACAS C M, de ANDRADE J, et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinistii* schwacke and *Siparuna guianensis* aublet [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2013, 2(4): 384–397.
- [4] RIBEAUCOURT D, HOFLER G T, YEMLOUL M, et al. Tunable production of (R)-or (S)-citronellal from geraniol via a bi-enzymatic cascade using a copper radical alcohol oxidase and old yellow enzyme[J]. *ACS Catal*, 2022, 12(2): 1111–1116.
- [5] 周玉慧. 天然柠檬醛衍生物的合成与抑菌活性研究[D]. 南昌:江西农业大学, 2014. [ZHOU Y H. Synthesis and antibacterial activity of natural citral derivatives[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2014.]
- [6] 何宗耀, 莫瑶江, 晏日安, 等. (E, E)-8-溴代香叶醛的合成[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1997(6): 121–123. [HE Z Y, MO Y J, YAN R A, et al. Synthesis of (E, E)-8-bromocoumarin[J]. Journal of Sun Yat-sen University: Natural Science Edition, 1997(6): 121–123.]
- [7] 胡建国. 酵母菌转化香叶醇和橙花醇的机制研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008. [HU J G. Mechanism of conversion of geraniol and nerolidol by *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2008.]
- [8] 胡建国. 酵母对香叶醇转变为香叶醛抗黑霉菌的研究[J]. *安徽农学通报*, 2012, 18(10): 48–59. [HU J G. Study on the conversion of geraniol to geranal by yeast against black mould[J]. *Anhui Agricultural Bulletin*, 2012, 18(10): 48–59.]
- [9] ZHENG Y G, YIN H H, YU D F, et al. Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(3): 987–1001.
- [10] IIJIMA Y, WANG G, FRIDMAN E, et al. Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, 448(1-2): 141–149.
- [11] SATO-MASUMOTO N, ITO M. Two types of alcohol dehydrogenase from *Perilla* can form citral and perillaldehyde[J]. *Phytochemistry*, 2014, 104: 12–20.
- [12] KRAUSE S T, LIAO P, CROCOLL C, et al. The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(52): e2110092118.
- [13] WOLKEN W A, van der WERF M J. Geraniol biotransformation-pathway in spores of *Penicillium digitatum*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(5-6): 731–737.
- [14] YUAN T T, CHEN Q Q, ZHAO P J, et al. Identification of enzymes responsible for the reduction of geraniol to citronellol[J]. *Natural Products and Bioprospecting*, 2011, 1(3): 108–111.
- [15] JOHNSON R. Biotransformations for bioremediation[J]. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(11): 1287–1289.
- [16] HALL M, HAUER B, STUERMER R, et al. Asymmetric whole-cell bioreduction of an α , β -unsaturated aldehyde (citral): Competing prim-alcohol dehydrogenase and C-C lyase activities[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, 17(21): 3058–3062.
- [17] 张永勤, 许文廷, 邢明霞, 等. 表面脱乙酰化甲壳素颗粒固定溶菌酶及酶学性质研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(5): 188–200. [ZHANG Y Q, XU W T, XING M X, et al. Immobilisation of lysozyme by surface deacetylated chitin particles and study of enzymatic properties[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(5): 188–200.]
- [18] 黄珍, 王慧, 黄芳, 等. 壳聚糖固定化海藻糖合酶[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(19): 130–141. [HUANG Z, WANG H, HUANG F, et al. Chitosan immobilisation of alginate synthase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(19): 130–141.]
- [19] DHIMAN S, SRIVASTAVA B, SINGH G, et al. Immobilization of mannanase on sodium alginate-grafted- β -cyclodextrin: An easy and cost effective approach for the improvement of enzyme properties[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156: 1347–1358.
- [20] BAI Y, WU W. The neutral protease immobilization: Physical characterization of sodium alginate-chitosan gel beads[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2022, 194(5): 2269–2283.
- [21] ABKA-KHAJOUEI R, TOUNSI L, SHAHABI N, et al. Structures, properties and applications of alginates[J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(6): 364–382.
- [22] 杨小叶, 马淑凤, 王利强. 海藻酸钠基凝胶球的制备、改性及其食品包装的应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(24): 376–383. [YANG X Y, MA S F, WANG L Q. Research progress on the preparation and modification of sodium alginate-based gel spheres and their application in food packaging[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(24): 376–383.]
- [23] 张懿婷. 多菌灵降解菌的筛选及转录组分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2022. [ZHANG Y T. Screening and transcriptome analysis of carbendazim-degrading bacteria[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2022.]
- [24] 陈炜烨, 刘冬冬, 徐建华, 等. ImageJ 软件在重组质粒 pET32a-CDK2 中蛋白表达的应用[J]. *中国热带医学*, 2014, 14(1): 23–25. [CHEN W Y, LIU D D, XU J H, et al. Application of ImageJ software for protein expression in recombinant plasmid pET32a-CDK2[J]. *China Tropical Medicine*, 2014, 14(1): 23–25.]
- [25] GERST R, CSERESNYES Z, FIGGE M T. JIPipe: Visual batch processing for ImageJ[J]. *Nat Methods*, 2023, 20(2): 168–169.
- [26] CHEN X, DOU Z, LUO T, et al. Directed reconstruction of a novel ancestral alcohol dehydrogenase featuring shifted pH-profile, enhanced thermostability and expanded substrate spectrum[J]. *Bioresour Technol*, 2022, 363: 127889.
- [27] 常开霞, 孙军勇, 李晓敏, 等. 胃乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 的原核表达及酶学性质[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(7): 78–85. [CHANG K X, SUN J Y, LI X M, et al. Prokaryotic expression and enzymatic properties of gastric ethanol dehydrogenase $\delta\delta$ -ADH[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(7): 78–85.]
- [28] 廉德君, 李林, 许根俊. 酵母醇脱氢酶 ADHI 的纯化及动力学研究[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1996(4): 396–403. [LIAN D J, LI L, XU G J. Purification and kinetic study of yeast

- alcohol dehydrogenase ADHI[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1996(4): 396–403.]
- [29] 袁建平, 候晓强. 固定化技术在壳聚糖酶生产中的应用 [J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(21): 5282–5284. [YUAN J P, HOU X Q. Application of immobilisation technology in chitosanase production [J]. *Hubei Agricultural Science*, 2013, 52(21): 5282–5284.]
- [30] SCHEIN C, NOTEBORN M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature[J]. *Bio/technology*, 1988, 6(3): 291–294.
- [31] 任彬, 李博, 范超, 等. L-天冬氨酸 α -脱羧酶异源表达和转化条件的优化 [J]. 大连工业大学学报, 2022, 41(1): 23–26. [REN B, LI B, FAN C, et al. Optimisation of heterologous expression and transformation conditions of L-aspartate α -decarboxylase[J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2022, 41(1): 23–26.]
- [32] 张经纬, 刘晓青, 田健, 等. 基于结构基础的嗜热细菌贝斯其热解纤维素菌木聚糖酶 CbXyn10C 的热稳定性分子改良 [J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5261–5274. [ZHANG J W, LIU X Q, TIAN J, et al. Structural basis for the molecular improvement of the thermal stability of thermophilic bacterium Beschichtung's thermolabile cellulolytic bacterial xylanase CbXyn10C[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(12): 5261–5274.]
- [33] TOKSOY E, ONSAN Z I, KIRDAR B. High-level produc-
tion of TaqI restriction endonuclease by three different expression systems in *Escherichia coli* cells using the T7 phage promoter[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59: 239–245.
- [34] ZHAO M, TAO X Y, WANG F Q, et al. Establishment of a low-dosage-IPTG inducible expression system construction method in *Escherichia coli*[J]. *J Basic Microbiol*, 2018, 58(9): 806–810.
- [35] EINSFELDT K, SEVERO JÚNIOR J B, CORRÊA ARGON-DIZZO A P, et al. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability[J]. *Vaccine*, 2011, 29 (41): 7136–7143.
- [36] EILERTSEN J, SCHNELL S. A Kinetic analysis of coupled (or auxiliary) enzyme reactions[J]. *Bulletin of Mathematical Biology*, 2018, 80(32): 3154–3183.
- [37] LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: Properties and biomedical applications[J]. *Prog Polym Sci*, 2012, 37(1): 106–126.
- [38] 罗空亮, 郝红英, 殷勇刚, 等. 多孔 HZIF-8 固定化酶及其降解苯酚的性能研究 [J]. *应用化工*, 2024, 53(3): 560–564. [LUO K L, HAO H Y, YIN Y G, et al. Porous HZIF-8 immobilised enzyme and its performance in degrading phenol[J]. *Applied Chemical Industry*, 2024, 53(3): 560–564.]