

## *Rhodococcus erythropolis* 手性醇脱氢酶的克隆表达及其性质

朱清禾, 贾红华\*, 李艳, 贾黎莎, 马莹莹, 韦萍

南京工业大学生物与制药工程学院, 材料化学工程国家重点实验室, 南京 211816

**摘要:** 【目的】探讨红串红球菌中一种醇脱氢酶的性质及其对酮酯类及酮类底物的催化能力。【方法】从红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277) 中获取一段长度为1047 bp的醇脱氢酶 (*adh*) 基因, 插入载体 pET-22b (+) 后, 在大肠杆菌中进行重组表达。15℃的低温下用自诱导培养基诱导24 h, 以苯乙酮为底物测定醇脱氢酶酶活。【结果】测得该诱导条件下重组菌体细胞破碎上清中醇脱氢酶酶活力为2.6 U/mg。经温度、pH 耐受性等分析, 发现该酶最适 pH 在 6.0 - 6.5 之间, 耐受温度可以达到60℃, 并且在该温度下保持5 h 后, 酶活也能保留 80%。对于  $\beta$  酮酯类底物的催化反应, 以对乙酰乙酸乙酯的催化能力最高。用 4-氯乙酰乙酸乙酯 (COBE) 为底物进行全细胞水相催化反应, 经手性液相色谱分析, 发现在催化产物以 R 型 4-氯-3 羟基丁酸乙酯 (CHBE) 为主。【结论】该酶在酮酯类的底物转化方面有良好的开发潜力及应用前景。

**关键词:** 手性醇脱氢酶, 自诱导, COBE, NADH

**中图分类号:** Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0083-07

当前手性化合物已成为重要合成模块, 广泛用于医药、农用化学品、香料等化学和制药工业。手性醇作为一类基础的手性化合物, 是需求量大的医药中间体。生物法由于具有高效、条件温和的特点, 逐渐成为手性醇制备的重要手段<sup>[1-2]</sup>。

尽管用生物法制备手性醇的方法有手性羰基还原酶法、水解酶法等多种, 但由于手性羰基还原酶法底物易得、产物选择性高, 已成为制备手性醇的首选方法<sup>[3-4]</sup>。目前已经从白地霉、木兰假丝酵母、近平滑假丝酵母等多种微生物中找到选择性转化羰基类化合物生成相应的醇类, 产物的对映体过量值 (e. e) 都大于 99%<sup>[5-6]</sup>。但是很多羰基还原酶都属于 NADPH 依赖型, 辅酶成本相对比较高, 开发更多 NADH 依赖型的羰基还原酶则更有利于降低成本<sup>[7-9]</sup>。

来源于红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) 中的一段醇脱氢酶基因 (*adh*), 其表达产物对一些芳香族的化合物有较好的转化率, 例如能催化苯乙酮生成 S 型的 1-苯乙醇, 生成产物的 e. e. 值可达 99% 以上<sup>[10]</sup>, 但该酶对其它类化合物的转化报道相对较少。本研究克隆该段基因并将其插入 pET-22b (+) 载体中, 采用自诱导培养基, 即利用乳糖操纵子原理, 通过控制培养基中葡萄糖与乳糖的量, 前期菌体利用葡萄糖生长到一定量, 直至葡萄糖基本耗尽后, 再在乳糖的诱导下进行产酶, 避免了使用 IPTG 诱导剂和 T7 强启动子易于引起蛋白表达过强形成包涵体的弊病<sup>[11]</sup>, 在增加表达产物中可溶蛋白的同时, 用乳糖替代 IPTG 作为诱导剂也有利于降低成本。本文主要以苯乙酮为底物, 测定了不同温度、pH 等条件下的最适酶活, 并对其性质进行了初步表征。

**基金项目:** 国家“973 项目”(2009CB724700); 国家自然科学基金项目(20906048)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-83172075; E-mail: hhjia@njut.edu.cn

**作者简介:** 朱清禾(1986-), 女, 江苏人, 硕士研究生, 主要方向为分子及生物催化。E-mail: zqh021@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2011-07-01; **修回日期:** 2011-11-04

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株:** *E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* DH5 $\alpha$  为本实验室保藏, pMD<sup>TM</sup> 18-T 载体购自

TaKaRa 公司, pET-22b (+) 载体为本实验室保藏, pET-22b-*adh* 是本实验构建的带醇脱氢酶基因 (*adh*) 的重组质粒, 红串红球菌 (*R. erythropolis* ATCC 4277) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。表 1 中列出了本实验中所用到的菌株和质粒的信息。

表 1 实验菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristic description	Source
Strains		
<i>R. erythropolis</i>	Source of <i>adh</i> gene	CGMCC
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	The host strain for pET-22b- <i>adh</i>	This laboratory
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	For the construction of plasmids	This laboratory
Plasmids		
pMD <sup>TM</sup> 18-T	For the storage and sequencing of DNA fragment	TaKaRa
pET-22b (+)	Amp <sup>r</sup> , for construction of the recombinant expression vector	This laboratory
pET-22b- <i>adh</i>	Amp <sup>r</sup> , for expression of the alcohol dehydrogenase gene	This study

**1.1.2 试剂:** T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde* I、*Hind* III 购于大连宝生物公司, *Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子量标准购于上海申能博彩生物有限公司, 蛋白分子量标准购于 fermentas, 基因组及质粒提取试剂盒均购于上海申能博彩有限公司, NADH 购于 Roche, 引物由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。其它的试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 培养基:** 自诱导培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 50 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mmol/L, 甘油 5 g/L, 葡萄糖 0.5 g/L, 乳糖 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 2 mmol/L; LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L; LB 固体培养基: LB 液体培养基中加入 20 g/L 的琼脂, 各培养基在使用前加入氨苄青霉素, 最终浓度为 100  $\mu$ g/mL。磷酸盐缓冲的配制方法参考文献<sup>[12]</sup>。

### 1.2 基因序列的扩增

用基因组提取试剂盒提取 *R. erythropolis* 基因组 DNA, 根据 GenBank 中的登记号为 AY161280 的醇脱氢酶基因的序列设计引物 ReADH\_F: 5'-GGAATTCATATGAAGGCAATCCAGTA (*Nde* I), ReADH\_R: 5'-CCCAAGCTTTCTACAGACCAGGG (*Hind* III)。以基因组 DNA 为模板, 用引物 ReADH\_F 和 ReADH\_R 对目的基因进行扩增。PCR 的扩增体系为: ddH<sub>2</sub>O 40.5  $\mu$ L, 10 $\times$  缓冲液 5  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, ReADH\_F 1  $\mu$ L, ReADH\_R 1  $\mu$ L, 4 $\times$  dNTP 1  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, PCR 的条件为: 94 $^{\circ}$ C

5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保温, 共循环 30 次。

### 1.3 重组质粒 pMD<sup>TM</sup> 18-T-*adh* 和 pET-22b-*adh* 的构建

PCR 的扩增产物经胶回收纯化后与 pMD<sup>TM</sup> 18-T 载体在 16 $^{\circ}$ C 下连接过夜。连接产物转化入感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 涂布于带氨苄青霉素抗性的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。通过双酶切及琼脂糖电泳的方法鉴定出阳性克隆子 pMD<sup>TM</sup> 18-T-*adh*, 将阳性克隆子测序并保存, 测序工作由南京金斯瑞公司完成。

用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 分别对载体 pET-22b (+) 和质粒 pMD<sup>TM</sup> 18-T-*adh* 进行消化, 将纯化后的 *adh* 的片段与线性化的载体 pET-22b (+) 进行连接, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。重组质粒用热休克的方法转入感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 以载体所带氨苄青霉素抗性筛选阳性转化子, 经双酶切及质粒 PCR 验证鉴定筛选出 *E. coli* BL21 (DE3) /pET-22b-*adh* 阳性克隆子。

### 1.4 培养基及培养条件

LB 培养基用于重组菌及对照菌的活化生长。从保存的平板上分别接 *E. coli* BL21 (DE3) /pET-22b (+) 菌和重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) /pET-22b-*adh* 至含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 活化培养 12 h 后以 2% 的接种量转接至新鲜的含 100  $\mu$ g/mL 抗生素的自诱导培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h 后转入 15 $^{\circ}$ C 摇床诱导 24 h。

## 1.5 粗酶液的制备及酶活测定

收集5 mL的菌液,4℃离心收集菌体沉淀,用PBS溶液(100 mmol/L, pH = 6.0)重悬,离心弃上清,将重悬及离心的步骤重复1次,最后用1 mL PBS(pH = 6.0)溶液重悬菌体沉淀。超声破碎(功率200 w,超声3 s,间隙5 s)5 min后,3490 × g,5 min,取上清为粗酶液,SDS-PAGE分析重组蛋白表达情况。蛋白电泳采用5%浓缩胶,12%分离胶,电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色。蛋白含量的测定采用 Bradford<sup>[12]</sup>的方法,以牛血清蛋白为标准品。

手性醇脱氢酶 ReADH 的酶活测定体系包括:磷酸钾缓冲液(pH = 6.0) 100 mmol/L,苯乙酮 1.45 mmol/L,NADH 0.25 mmol/L。加入200 μL酶液在30℃下启动反应,测定340 nm处的吸光值变化<sup>[10]</sup>。醇脱氢酶的酶活定义:1 min内转化1 μmol NADH 所需要的酶量为一个单位(U)。

考察 ReADH 对不同类底物的活力时,选用了4-氯乙酰乙酸乙酯、乙酰丙酮等七种底物,反应体系为:磷酸钾缓冲液(pH = 6.0) 100 mmol/L,底物 6 mmol/L, NADH 0.25 mmol/L, 200 μL 粗酶液。

## 1.6 全细胞水相催化

将50 mL诱导后的重组菌 *E. coli* BL21/pET-22b-*adh* ( $OD_{600}$  约为 10)充分重悬于20 mL磷酸缓冲液(100 mmol/L, pH 6.0)中,同时在催化体系中加入0.1 mmol/L NADH, 278 mmol/L 葡萄糖,5 g/L COBE,0.1% (v/v) Triton X-100,在200 r/min和30℃下振荡反应一段时间后,按4:1的比例加入醋酸乙酯终止反应并萃取反应的产物及底物。

## 1.7 COBE 及 CHBE 的检测

产物 CHBE 用气相色谱进行检测,气相色谱用 FFAP 改性聚乙二醇毛细管柱,载气为氮气,进样量 1 μL,梯度升温<sup>[13]</sup>:初始温度60℃,保持2 min,再以40℃/min的速率升温至120℃,保持4 min,最后以40℃/min升温至180℃,保持2 min。进样温度220℃,检测器温度250℃。而产物的对映体过量值用产物对映体过量值(e. e.)的测定使用高压液相色谱仪,分析条件为:Chiralcel OB 手性色谱柱(4.6 mm × 250 mm),以正己烷/异丙醇(二者的体积比9/1)为流动相,流速为0.8 mL/min,紫外检测器,检测波长217 nm。

## 2 结果和讨论

### 2.1 重组质粒 pET-22b-*adh* 的构建

以红串红球菌的基因组 DNA 为模板,用引物 ReADH\_F 和 ReADH\_R 进行 PCR 扩增,得到长度约为1.1 kb的 DNA 片段。将该片段克隆到 pMD<sup>TM</sup>18-T 载体上得到重组质粒 pMD<sup>TM</sup>18-T-*adh*。经测序确定插入片段长度为1047 bp,与已报道的醇脱氢酶基因序列(GenBank 登录号 AY161280)相似度大于99%,经翻译后的氨基酸序列与已知序列(登录号: AAN73268.1)仅有一个氨基酸的突变 R110Q。用 *Nde* I 和 *Hind* III 对 pMD<sup>TM</sup>18-T-*adh* 进行双酶切,将目的片段克隆到 pET-22b(+)相应位点上,得到了重组表达质粒 pET-22b-*adh*,对该质粒的 PCR 及双酶切验证如图 1 所示。由于选用了 *Nde* I 酶切位点,使后续的表达产物 N 端去除了载体自带的信号肽序列。

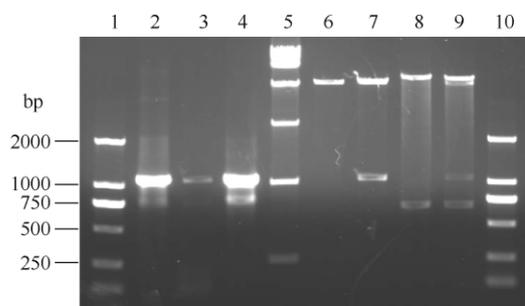


图 1 重组质粒的 PCR 及双酶切验证

Fig. 1 PCR and double restriction enzymes digest of recombinant plasmid. 1. DL 2000; 2. pET-*adh* 1; 3. pET-*adh* 2; 4. pET-*adh* 3; 5. DL 15000; 6. pET-22b; 7. pET-*adh* 1; 8. pET-*adh* 2; 9. pET-*adh* 3; 10. DL 2000.

### 2.2 重组质粒诱导表达

将 pET-22b(+)空载体及重组质粒 pET-22b-*adh* 分别转入感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3),用氨苄青霉素的平板筛选阳性克隆子。筛选得到并经验证后的重组菌在自诱导培养基中15℃下诱导表达24 h后,收集菌体,用缓冲液洗菌并重悬细胞,超声破碎,取粗酶液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。以 *E. coli* BL 21/pET-22b(+)表达产物为对照,从图 2 的结果可以看出在重组菌的蛋白中有明显的表达条带,大小在45 kDa左右。测得表达后粗酶液中醇脱氢酶的比活力为2.6 U/mg。

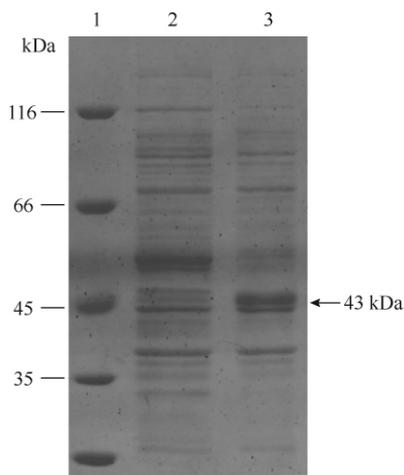


图2 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis. 1. Protein Marker; 2. *E. coli* BL21 (DE3) /pET-22b(+); 3. *E. coli* BL21 (DE3) /pET-22b-*adh*.

### 2.3 不同温度对酶活的影响

取1 mL粗酶液分别在40℃, 50℃, 60℃, 65℃四个温度中热激5 min, 以热激前的比酶活为100%。结果如图3所示。

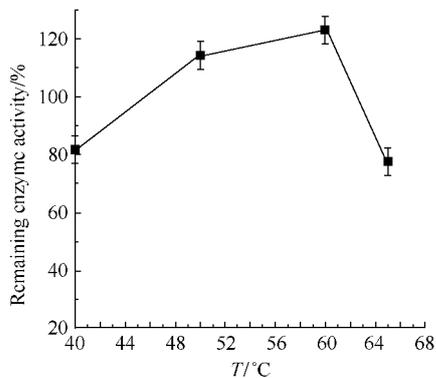


图3 重组醇脱氢酶的温度耐受性

Fig.3 Tolerances of recombinant alcohol dehydrogenase in different temperatures.

在水浴温度不高于60℃热激时, 单位酶活(U/mL)没有明显降低, 但是热激受热后, 粗酶液中的很多杂蛋白变性沉淀, 降低了总蛋白量, 因此比酶活有所升高, 这一性质对于后期分离纯化是有利条件, 可以快速去除杂蛋白。而当温度升高到65℃热激后, 单位酶活则已大大降低, 只保留了热激前酶活的75%, 65℃水浴半小时后, 酶的活力只剩下55%, 可见酶在65℃下失活速率比较快。70℃热激后则已无酶活。

而酶液在60℃的温度下放置1 h, 未见有明显的酶活损失。图4显示出该醇脱氢酶在60℃条件下,

保温时间与酶活的关系。可以看出即使是60℃水浴中放置5 h后酶活也并没有损失太大。

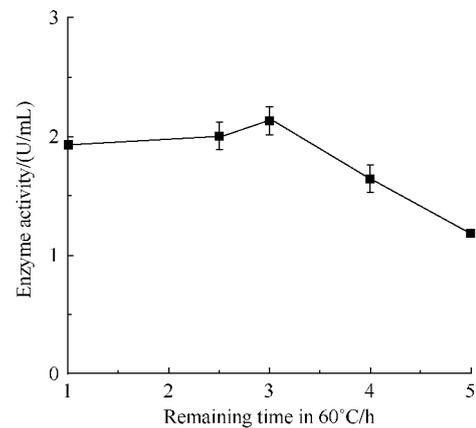


图4 在60℃中的热稳定性

Fig.4 Thermostability of the enzyme in 60℃.

### 2.4 不同pH的缓冲对酶活的影响

配制pH 3.3-8.2的缓冲溶液<sup>[9]</sup>, pH < 6.0用醋酸缓冲液, 6.0 < pH < 8.0用磷酸缓冲液, pH > 8.0用Tris HCl缓冲液, 将细胞悬于上述不同的pH缓冲液中, 超声破碎后, 取粗酶液测定酶活力的变化。其结果显示在图5中。

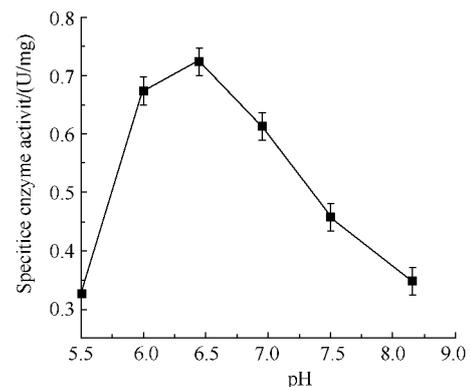


图5 不同pH缓冲下醇脱氢酶相对酶活的变化

Fig.5 Specific enzyme activity in different pH buffers.

在pH 6-6.5左右时, 红串红球菌醇脱氢酶活力是最高的, 此时最高比酶活约为0.75 U/mg, 相对之前测定的值较低, 这可能是保存的重组菌有一定退化所致。当缓冲液pH低于5时, 大部分蛋白变性沉淀, 已无酶活。

### 2.5 Zn<sup>2+</sup>对酶活影响的研究

红串红球菌中的醇脱氢酶属于中链脱氢酶家族, 其中通常包含一段Zn<sup>2+</sup>离子结合的区域。经过序列比对后推测C38、G61、H62、C91在酶折叠后会处

于活性中心附近,与  $Zn^{2+}$  结合,影响酶活<sup>[14]</sup>。 $Zn^{2+}$  影响酶活的方式可以分为两种,一种是在酶折叠的过程中支撑酶结构,最终影响到酶的活性;另一种则是单纯地进入活性中心,在催化过程中影响酶活。

本研究在将细菌转接之前,在自诱导培养基中加入  $ZnCl_2$ ,初步考察在培养基中加入不同  $Zn^{2+}$  浓度对最终表达后酶活的影响。分别在自诱导培养基中加入终浓度为 0、1、1.4、2、3、4 和 5 mg/L 以同样的条件进行细胞培养及诱导产酶,酶活测定得到的结果如图 6 所示。可以看到在加入  $Zn^{2+}$  浓度小于 2 mg/L 时酶活随着  $Zn^{2+}$  浓度升高而升高,在加入 2 mg/L  $Zn^{2+}$  时,酶活最高,达 3.5 U/mL;而  $Zn^{2+}$  浓度为 2-4 mg/L 时,酶活随着  $Zn^{2+}$  浓度升高而降低; $Zn^{2+}$  浓度高于 4 mg/L 时,酶活基本不变。

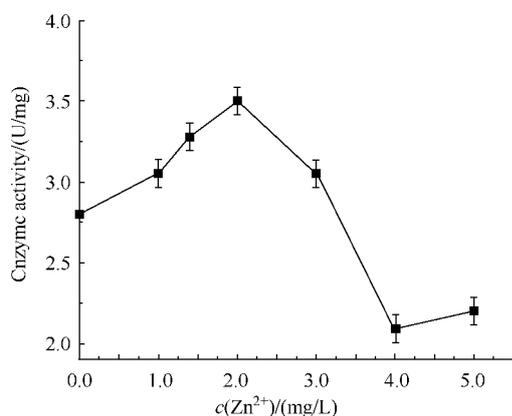


图 6  $Zn^{2+}$  浓度对酶活的影响

Fig. 6 The effects of the concentration of  $Zn^{2+}$ .

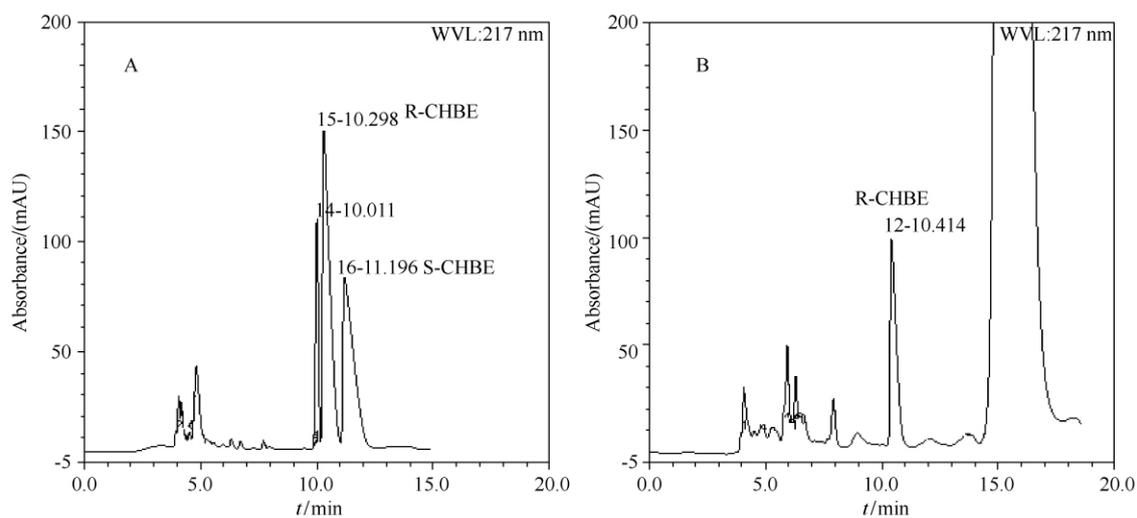


图 7 液相色谱图

Fig. 7 HPLC results. A: standard sample of R, S-CHBE; B: sample of biotransformation.

## 2.6 对不同底物的活力

红串红球菌醇脱氢酶对芳香族化合物有较好的转化率已有报道,本研究主要考察该酶对酮酯类及酮类底物的催化能力。选取 7 种不同底物进行测定,结果如表 2 所示。

表 2 酶对不同底物的酶活

Substrates	Relative activity / %
acetophenone	100
Ethyl-2-chloro-acetoacetate	276
Ethyl-4-chloro-acetoacetate	400
Ethyl acetoacetate	1700
Methyl acetoacetate	727
2,3-pentandion	312
2,3-Butanedione	74.8
4-Pyridinecarboxaldehyde	26.8

该酶对于酮类化合物或是吡啶醛化合物的催化能力不及  $\beta$  酮酯类化合物。在酮酯类底物中,又以对乙酰乙酸乙酯的催化活力最高,为其对苯乙酮活力的 17 倍;对 4-氯乙酰乙酸乙酯也有非常好的转化率,催化活力为苯乙酮的 4 倍。

催化生产高光学纯度的 CHBE 具有很好的经济价值。目前对 4-氯乙酰乙酸乙酯的转化很多是 NADPH 依赖型的酶并且来源于真菌,而该酶是 NADH 依赖型,如用于生产,可降低成本。因此本研究以 4-氯乙酰乙酸乙酯为底物经过全细胞催化后,得到的产物 e. e. 值大于 98%,且为 R 型,手性色谱图如图 7 所示。目前存在的问题是,COBE 虽然能较好地还原成对应的 (R)-CHBE,但是转化率较

低。采用不同底物浓度在全水相体系进行催化反应,经24 h之后转化率也只达到30%。在后续实验中拟测试含不同有机溶剂的双相体系,通过改变底物和产物在两相中的分配比进而提高转化率。

### 3 结论和展望

从红串红球菌中克隆到一段1047 bp的基因,并成功地在大肠杆菌中表达。对该酶性质的研究表明,找到了该酶的最高耐受温度60℃,最适pH 6.0-6.5。同时,发现该酶对 $\beta$ -酮酯类化合物有较高的转化能力。在30℃条件下转化COBE时,生成R型而非S型产物,为COBE等类似底物的生产提供了一条新的途径。但对COBE转化率仍有待通过改善反应体系等手段提高,如采用有机-水双相系统或固定化细胞进行催化。

### 参考文献

- [1] Hummel W. New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1997, 58: 145-184.
- [2] 吴希, 张翀, 邢新会. 手性醇脱氢酶与甲酸脱氢酶的融合蛋白体系的构建. *化工学报 (CIESC Journal)*, 2009, 60(10): 2562-2566.
- [3] Goldberg K, Schroer K, Lutz S, Liese A. Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 2007, 76(2): 237-248.
- [4] 孙万儒. 手性化合物的生物合成与转化. *化工文摘 (China Chemicals)*, 2003, 6: 5-7.
- [5] 刘湘, 方志杰, 许建和. 酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应. *催化学报 (Chinese Journal of Catalysis)*, 2006, 1: 20-24.
- [6] Mandal D, Amhad A, Khan M, Kumar R. Enantioselective bioreduction of acetophenone and its analogous by the fungus *Trichothecium* sp. *Journal Of Molecular Catalysis. B: Enzyme*, 2004, 27: 61-63.
- [7] Ye Q, Yan M, Yao Z, Xu L, Cao H, Li ZJ, Chen Y, Li SY, Bai JX, Xiong J, Ying HJ, Ouyang PK. A new member of the short-chain dehydrogenases/reductases superfamily: Purification, characterization and substrate specificity of a recombinant carbonyl reductase from *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 6022-6027.
- [8] 金永琴, 徐娴, 毛政, 何冰芳. 乙醛还原酶工程菌的构建以及与葡萄糖脱氢酶工程菌偶联还原制备R-CHBE. *化工进展 (Chemical Industry and Engineering Progress)*, 2010, 6: 1120-1124.
- [9] 孙志浩, 何军邀. 生物催化制备光学活性4-氯-3-羟基丁酸酯研究进展. *化工进展 (Chemical Industry and Engineering Progress)*, 2005, 25(6): 623-628.
- [10] Abokitse K, Hummel W. Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2003, 62: 380-386.
- [11] F. William Studier. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41: 207-234.
- [12] Ausubel FM. 精编分子生物学实验指南. 马学军, 舒跃龙等译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [13] Ye Q, Yan Q, Xu L, Cao H, Li ZJ, Chen Y, Li SY, Ying HJ. A novel carbonyl reductase from *Pichia stipitis* for the production of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. *Biotechnol Letters*, 2009, 31: 537-542.
- [14] Esosito, L., Sica F, Raia C. A, Giordano A, Rossi M, Mazzarella L, Zagari A. Crystal structure of the alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* at 1.85 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 318(2): 463-477.

# Cloning, expression and characterization of chiral alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Qinghe Zhu, Honghua Jia<sup>\*</sup>, Yan Li, Lisha Jia, Yingying Ma, Ping Wei

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing 211816, China

**Abstract:** [Objective] We characterized alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* to catalyze ketoesters or ketones. [Methods] We cloned alcohol dehydrogenase gene (*adh*) of 1047 bp from *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, inserted the open reading frame of *adh* into vector pET-22b(+) and expressed in auto-inducing media for 24 h at 15°C. The enzyme activity was determined at 30°C using acetophenone as substrate. [Results] Under the above conditions, the specific enzyme activity of crude extract was 2.6 U/mg. The optimal pH was between 6.0 and 6.5 and the enzyme can survived up to 60°C. After incubation at 60°C for 5 h, 80% enzyme activity remained. The optimal substrate among  $\beta$ -ketoesters examined was ethyl acetoacetate. Ethyl 4-chloroacetoacetate was catalyzed by whole cell in aqueous phase. After chiral liquid chromatography, the product showed (R)-enantioselective. [Conclusion] The study shows that the enzyme might have potential in  $\beta$ -ketoesters transformation on industrial scale.

**Keywords:** Chiral alcohol dehydrogenase, auto-induction, NADH

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (973 Program) (2009CB724700) and by the National Natural Science Foundation Program of China (20906048)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-83172075; E-mail: hhjia@njut.edu.cn

Received: 1 July 2011/Revised: 4 November 2011

## 细菌 spore 的中文名称统一使用“芽胞”

2010 年末《微生物学报》重新修正了“投稿须知”,并于 2010-12-28 在网站上重申,严格规范本刊使用的微生物学名词。要求作者和审稿专家按照全国科学技术名词审定委员会审定、公布的名词进行使用。参考书目:全国自然科学名词审定委员会. 微生物学名词. 第一版. 北京:科学出版社,1988。(注:此书的第二版正在编写中,出版后将以第二版为准。)

本刊编委、华中农业大学生命科学技术学院教授孙明博士对“细菌 spore 的中文名称”有着深刻的了解,并为这个名词在我国微生物学领域的规范化使用做了很多的工作。以下内容节选自孙明教授近日为本刊撰写的一组内容。利于更多的研究人员清晰《微生物学报》新的规定,知其然更要知其所以然。

1. 在全国科学技术名词审定委员会、微生物学名词审定委员会编辑出版的《微生物学名词》(1988,科学出版社)中,关于细菌 spore 这一名词的中文名称,使用的是“芽胞”。理由是,“孢”指真菌和放线菌中的“孢子”,是指繁殖体;而细菌中的“芽胞”是指分化体,不是繁殖体,二者有本质的区别,其差异是有科学意义的。就像中文当中有一词多意的现象一样,spore 也可一词多意。

2. 2006 年 4 月成立了以中国科学院微生物研究所程光胜为主任的新一届微生物学名词审定委员会,该委员会在 2006 年 10 月的工作会议上决定维持 1988 年版《微生物学名词》中关于芽胞的命名方式。

3. 在我国,越来越多的使用“芽胞”二字,证明生物工作者有意识的在更正和推广“芽胞”来替代以前使用的“芽孢”。如:许多教材、书籍在依据《微生物学名词》使用“芽胞”;部分学术期刊在使用“芽胞”;在网上搜索的电子教案、教学资料或试卷中,找到许多使用“芽胞”的例子;在因特网如 google (www.google.com) 和百度 (www.baidu.com) 上输入“芽胞”进行搜索,可发现海量的使用“芽胞”例子。