

辅酶再生体系的研究进展

张 颖 邢新会*

(清华大学化学工程系生物化工研究所,北京 100084)

摘 要 辅酶再生是实现氧化还原酶催化反应的必需步骤,是关系到氧化还原酶工业应用的关键。通过介绍酶法再生和电化学方法再生的机理,分别总结了有关还原态辅酶和氧化态辅酶再生方法的研究现状,包括酶学再生过程中涉及到的酶、自由酶和整体细胞再生及其反应器的设计;以及电化学再生中电极修饰及中间体选择等。并提出了辅酶再生研究的潜在发展方向。

关键词 辅酶再生, 酶, 电化学, 生物催化, 氧化还原

中图分类号 Q552 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0811-06

1 辅酶再生研究的重要性

工业生物催化已经成为生物技术中一个新兴和具有巨大发展前景的领域,随着生物催化技术的不断成熟和广泛应用,将形成继生物制药、生物农业后的第三次生物技术浪潮^[1]。作为生物催化剂的酶在工业生物催化中起着关键性的作用。

据统计,目前已知大约 3500 种酶,其中只有 15% 已经应用于商业用途^[2]。但到目前为止,进入大规模工业应用的酶只有十几种,且大多属于水解酶^[3]。因此,开发其他种类酶的工业应用将是工业生物催化研究的重要课题。其中值得重视的是氧化还原酶的应用研究。由于很多化学和生物转化都离不开氧化还原过程,发展应用氧化还原酶的生物催化技术非常引人注目。利用氧化还原酶催化反应能够开拓大量的新的生物有机合成路线,可以广泛运用于如手性合成、制药、食物添加剂、香味剂、杀虫剂等生物制造方面^[4]。

目前已知的氧化还原酶数量超过 650 种,其中大约 90 种具有商业用途^[2]。所有的氧化还原酶中大约 80% 需要尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD, NADH)作为辅酶,10% 的酶以尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP, NADPH)为辅酶,只有很少一部分以黄素(FMN, FAD)和辅酶 Q(PQQ)为辅酶。

使用氧化还原酶进行生物催化时,合成产物的同时会消耗一定量的辅酶,辅酶的高效供应是开发氧化还原酶催化反应的关键技术之一。而这些辅酶往往价格昂贵,稳定性低,从技术经济角度考虑,投加大量辅酶是不可行的。另一方面,大多数氧化还原酶都被其他类型的过量辅酶抑制,这一问题也限制了氧化还原酶的实际应用。因此,根据生物催化反应的过程经济性和工业可行性,氧化还原酶在应用中除了

必须有合适的酶和反应工程技术以外,还必须提供高效、低成本的辅酶再生系统。所谓辅酶再生,就是把辅酶从氧化态再生为还原态,或者反之,从而使辅酶保持在一定的催化剂量水平。近些年来,为了解决辅酶再生这一问题,已经提出了一系列的方法,包括化学、光化学、酶学和电化学等再生系统^[5],其中尤以酶法再生和电化学再生系统受到广泛重视。本文根据酶法再生和电化学方法再生的机理,分别总结了有关还原态辅酶和氧化态辅酶再生方法的研究现状,包括酶学再生过程中涉及到的酶和整体细胞及其反应工程问题,并对今后辅酶再生的研究发展趋势进行了展望,以期对我国基于辅酶再生的氧化还原酶催化的研究发展起到抛砖引玉的作用。

在 2003 年末连续有两篇关于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^[6,7],表明辅酶再生受到了极大的重视。前者主要集中对 ATP、糖苷和 PAPS 的再生研究最新进展进行总结,这一内容是辅酶再生近年来的重要进展,但没有作为本综述的重点;后者对 NAD(P)和 NAD(P)H 的再生进行了综述,并且关注于酶学再生和电化学再生两个重要研究领域。本文不仅关注再生系统中酶及酶系统的研究进展,还对反应工程问题,游离酶及整细胞应用比较都进行了阐述,在对辅酶再生的研究展望方面本文也提出新的思路和方法。

2 辅酶的酶法再生

辅酶的酶法再生包括底物耦联法和酶耦联法。底物耦联法(图 1)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^[5]。这种再生系统

收稿日期:2004-04-20, 修回日期:2004-07-14。

基金项目:973 计划项目资助(No. 2003CB716003)。

* 通讯作者。 Tel:86-10-62772294; Fax:86-10-62770304; E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn

使用简单,但是要求酶能够同时作用于目标底物和辅助底物,通常会降低酶催化效率,有时高浓度辅助底物会抑制酶活性,除此之外还需要将产物与辅助底物分离,增加了分离操作的复杂性^[5]。酶耦联法(图2)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^[5]。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。酶耦联法再生效率高,但由于需要外加酶和对应的底物,再生系统较复杂,过程控制难^[5,8]。

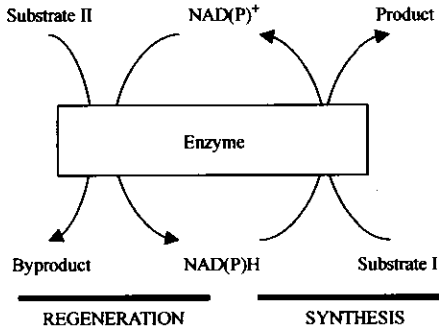


图1 底物耦联的辅酶循环

Fig. 1 Cofactor regeneration by substrate coupling method

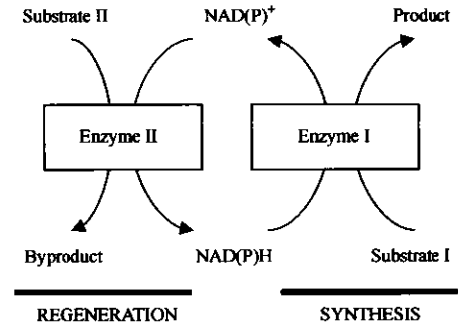


图2 酶耦联的辅酶循环

Fig. 2 Cofactor regeneration by enzyme coupling method

2.1 还原态辅酶 NAD(P)H 再生的常见酶体系

酶法再生还原态的辅酶的研究主要集中在寻找合适的再生系统上,目前所采用的再生酶包括:甲酸脱氢酶(FDH),葡萄糖脱氢酶(GDH),醇脱氢酶和氢化酶等,各种酶的用途、反应及优缺点如表1所示^[5,9,10,11,12]。其中尤以FDH应用最广,但是一般情况下只能对NADH进行再生。通过多位点突变来源于甲基营养菌 *Pseudomonas* sp. 101 的FDH(EC 1.2.1.2),使其对NADP⁺的活性达到野生型FDH对NAD⁺活性的60%^[9],从而也能够再生NADP,这将极大扩展FDH的应用范围。

表1 还原态辅酶再生的常见酶体系

Table 1 Systems for the regeneration of reduced-state cofactor

酶	用途	反应	优点	缺点
甲酸脱氢酶 (FDH) ^[5,9]	NADH 再生	甲酸生成 CO ₂	甲酸和 CO ₂ 对酶无毒和易于去除, 已有商业化产品	酶的成本高, 酶活低, 不能对 NADPH 再生
葡萄糖脱氢酶 (GDH) ^[5,10]	NADH 和 NADPH 的再生	氧化葡萄糖为葡萄糖内酯, 自发转变为葡萄糖酸	稳定性好, 对 NAD ⁺ 和 NADP ⁺ 都有很高的比活性	GDH 价格昂贵, 产物与葡萄糖酸分离困难
醇脱氢酶 (ADH) ^[5,11]	NADH 和 NADPH 再生	氧化乙醇生成乙醛	价格适中, 乙醇与乙醛具有挥发性, 易于取出	氧化还原能力低, 若不及时去除乙醇和乙醛, 将会抑制酶的活性
氢化酶 ^[5,12]	NADH 再生	分子氢直接氧化 NAD ⁺ , 生成 NADH	还原能力很强; 对酶和辅酶无毒; 无副产物生成	氢化酶的稳定性很差, 对氧气非常敏感, 无商业化产品

还原态辅酶再生 NAD(P)H 的一个应用的实例是: *Escherichia coli* JM109 (pGDA2) 过量表达来自于 *Bacillus megaterium* IWG3 葡萄糖脱氢酶基因, 当提供 NADP⁺ 和葡萄糖时, *E. coli* JM109 (pGDA2) 能够作为 NADPH 的再生系统。利用此 NADPH 再生系统, 实现过量表达乙醛还原酶的 *E. coli* JM109 (pKAR) 用于手性还原乙烷基, 和 4-氯乙基-3-氧代丁酸盐^[10]。

2.2 氧化态辅酶 NAD(P)⁺ 的再生的常见酶体系

酶法再生氧化态辅酶采用酶耦联再生方法, 一般常用的底物和酶组合为: α -酮戊二酸和谷氨酸盐脱氢酶, 丙酮酸和乳酸脱氢酶, 乙醛和酵母酒精脱氢酶或者 NADH 氧化酶, 如表2所示^[5,10,13]。其中, NADH 氧化酶是极具潜力的氧化态辅酶再生体系之一, 在实际应用中, 依赖 NAD⁺ 的 R 型特异乙醇脱氢酶 (R-specific ADH) 可以在 R, S-1-苯基乙醇中让 R 型对映体完全氧化, 从而生产纯的 S 对映体, NADH 氧化酶与此

过程耦合, 为 ADH 提供再生 NAD⁺^[13]。

此外, 研究者也在开发新酶用于氧化态辅酶的再生。例如铁氧还原蛋白-NADP⁺ 还原酶 (FNR, EC 1.18.1.2) 能够催化 NADPH 氧化再生 NADP⁺。来自于 *Anabaena* PCC 7110 的 FNR 已经成功克隆并在 *E. coli* 中得到表达, 为 FNR 的大量生产奠定了基础^[14]。

2.3 游离酶再生系统与细胞内再生系统的优缺点

上述辅酶再生系统在实际应用中可以以游离酶的状态, 或者以细胞内的系统两种方式进行再生。游离酶直接再生由于可控性强, 易于放大并且可以连续操作, 具有明显的优势。但是它的主要缺点是使用纯酶成本过高, 酶的稳定性和寿命有限。因此把酶法再生体系应用到微生物细胞内, 从而达到人们需要的生物转化要求也是辅酶再生领域的一个重要研究方向。

表2 氧化态辅酶再生的常见酶体系
Table 2 Systems for the regeneration of oxidized-state cofactor

酶	用途	反应	优点	缺点
谷氨酸盐脱氢酶 ^[5]	NAD(P) ⁺ 再生	α -酮戊二酸还原生成 L-谷氨酸, α -酮己二酸还原生成 L- α -氨基己二酸	常用再生体系,可以结合生产有用产物 L- α -氨基己二酸	酶的成本高
乳酸脱氢酶 ^[5]	NAD ⁺ 的再生	丙酮酸还原生成 L-乳酸	酶比活性高、酶源廉价	氧化还原能力低,不能再生 NAD(P) ⁺
酵母酒精脱氢酶 ^[5,10]	NAD ⁺ 的再生	乙醛还原生成乙醇	价格适中,乙醇与乙醛具有挥发性,易于取出	酶容易失活,若不及时去除乙醇和乙醛,将会抑制酶的活性,不能再生 NAD(P) ⁺
NADH 氧化酶 ^[13]	NAD ⁺ 的再生	与氧反应生成水或者过氧化氢	对于产物为水的,副产物对反应无影响	无商业化产品,对于产物为过氧化氢的需加入过氧化氢酶

一个典型的例子就是贝克酵母。贝克酵母是第一个用于生产手性还原羰基化合物的微生物,它作用的底物范围广,在很多情况下具有好的或者高的对映和非对映异构选择性。在贝克酵母为媒介的还原反应中,NAD(P)H 作为质子供体在细胞内从其对应的氧化形式连续再生^[15]。然而,使用整个细胞作为包含再生系统的还原反应也会遇到很多困难,主要包括:(1)生物系统的基因具有可变性,还原反应中的酶在同一类生物的不同种中不一定一样;(2)由于生理特性的可变性,为了重现报道结果,培养条件、菌龄、生物代谢活性也必须一致;(3)产物和底物在细胞膜上的传递比较困难;(4)由于大量非自然的底物对于活细胞是具有毒性的,因此微生物转化效率非常低;(5)为了辅酶再生,过剩的辅助底物在辅酶再生的同时会形成副产物影响产物的纯度;(6)有机相对微生物细胞往往具有毒性^[2]。

还有一些体系必须使用整个细胞进行生物转化。例如单-或者双-加氧酶能够活化分子氧(O₂),在诸如烷烃、芳香族和石蜡这样的化学惰性分子上立体异构地加入一个氧原子。氧化酶使用低氧化态的金属(例如 Fe²⁺ 或者 Cu²⁺)来活化氧,它们往往需要提供 NAD(P)H 辅酶。因为自由酶会被反应过程中产生的活化中间体失活,必须使用能够再生 NAD(P)H 的整个细胞,而不是自由酶^[16]。

此外,通过代谢调控改变细胞内辅酶的再生途径,能够改变细胞的代谢功能和氧化还原酶生物催化的产品构成。例如 De Felipe *et al* 采用了一种叫做“辅助因子工程”(cofactor engineering)的方法,构建了 NADH 氧化酶过量表达的 *Lactococcus lactis* 菌株^[17]。该 NADH 氧化酶能够将 NADH 氧化为 NAD⁺ 和水。在基因工程菌株 *L. lactis* 细胞中过量表达 150 倍原始菌株的 NADH 氧化酶,降低了细胞内 NADH/NAD⁺ 的比率,从而使葡萄糖在耗氧分解代谢过程中从单一的乳酸发酵转变为混合酸发酵。Cofactor engineering 是目前值得关注的研究方向。

2.4 辅酶再生体系的反应工程问题

高效的反应工程系统也是决定辅酶再生效率的重要因素。需要解决的主要问题是维持酶和辅酶长期存留在反应体系中。主要的方法为酶的固定化。一般来说,固定化

能够使酶稳定,但是在固定化过程中不同的操作步骤有可能使那些比较脆弱的酶失活。因此固定化技术仅仅应用于一些相对比较强的氧化还原酶,例如葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶等。为解决这一问题,应用膜反应器来进行酶催化合成反应。从辅酶再生的经济性出发,使用连续流膜反应器也是将辅酶截留在体系内的有效方法。由于要使辅酶保留在膜系统内,必须使其有足够大的尺寸,为此利用水溶性高分子修饰辅酶,如葡聚糖,聚乙烯亚胺和聚乙烯乙二醇等,得到分子量足够大的水溶性高分子衍生物从而增加在膜体系内的截留率。Jose Maria Obon *et al*^[18] 的研究表明,当 PEI/NAD(P)H 的摩尔比大于 1 时,膜反应器具有很高的截留率。这类膜反应器主要是截留蛋白以及连接在水溶性高分子上的辅酶。但是这种方法也有它的缺点,有些酶不一定能够利用接枝在水溶性高分子上的辅酶。为此,研究者进一步提出了带电膜反应器,在 pH > 4 时,NAD(P)⁺ 和 NAD(P)H 带负电,带负电的超滤膜能够使 NAD(P)H 保持在反应器内,而不用固定化辅酶^[19]。

3 辅酶的电化学再生

电化学方法是通过电极超电势作用直接把辅酶氧化或者还原到需要的状态。然而,由于电极对辅酶有很强的吸附作用,会抑制氧化的过程。通过选择适合的电极材料可以显著降低超电势,并且强化过程。特殊的电极预处理能够降低吸附,增加辅酶的产生能力。为了实现有效的电极再生,还需要电催化中间体进行电子的氧化-还原^[8]。

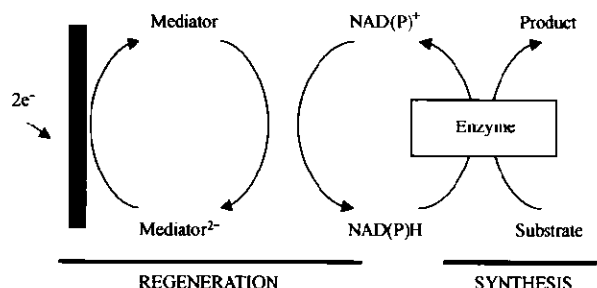


图3 电化学辅酶再生循环

Fig. 3 Cofactor regeneration by electro-chemical method

3.1 NAD(P)H 氧化再生 NAD(P)⁺

相对来说,因为不需要添加电子传递介质,NADH 的直接氧化比较容易实现。但这一方法目前还没有在大规模的氧化反应中应用,这是由于直接氧化有两个主要的缺点:第一个问题是为了有效转化还原态的辅酶必须克服大约 1V 的超电势。这不但会导致副产物的产生或者使酶失去活性,而且还会破坏辅酶本身性质,降低转换效率以及导致电极沉积。第二个问题是电极材料也非常重要,很难找到适合于放大的材料。

类似于商业染料的双电子-质子转移载体醌型化合物或者苯二胺能够降低 NADH 氧化的超电势,使得其氧化电势为 0~200mV(Ag/AgCl)。这一方法的缺点是通常介质与还原态辅酶之间电子传递的均一性较低。另一个缺点在于还原电势和速率常数,甚至反应和电子转移介质的稳定性都与 pH 相关。大多数这类介质在碱性环境下都不稳定,然而碱性却是脱氢酶催化氧化反应的最适条件。

另一类介质是单电子传递载体,例如 ABTS²⁻(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate))。这类载体虽然一般都有更高的还原电势,但仍然低于应用于 NADH 氧化的电势。因此,这类载体很少用于分析用途,主要是因为易于氧化的物质容易发生副反应。然而,ABTS²⁻/ABTS-对于大规模的合成却是一种有用的介质,因为即使在碱性条件下它的激发态的阳离子都具有非常好的稳定性。ARTS 已经在很多不同酶的反应耦合上成功应用,采用 ABTS²⁻作为电子传递载体可以有效地达到电化学氧化 NADH 的目的。这一通过介质的电化学氧化过程用于马肝脏酒精脱氢酶氧化内消旋二醇生成手性内脂的反应中的辅酶再生,使产率达 93.5%,纯度达 99.5%以上^[20]。

除了直接氧化,也可以像还原态辅酶再生那样在电极上通过固定化酶来实现再生。Tayhas *et al.*^[21]构建了甲醇/氧气燃料电池,在电池的正极利用心肌黄酶催化辅酶再生。由于在正极氧化甲醇为二氧化碳的脱氢酶需要 NAD⁺辅酶,心肌黄酶通过甲基紫精(methyl viologen)催化将 NADH 氧化为 NAD⁺,实现了 NAD⁺再生。

3.2 NAD(P)⁺ 还原再生 NAD(P)H

直接把 NAD(P)⁺还原为 NAD(P)H 远比 NAD(P)H 氧化为 NAD(P)⁺复杂,反应步数多,但是直接用电化学方法再生 NAD(P)H 仍然非常引人注目。它的最大优点是适应性强,成本较低。缺点是通过直接电化学方法还原 NAD⁺会产生没有活性的二聚体和 NADH 异构体,而且反应速度慢,选择性差。另一个缺点是往往需要克服很高的超电势,造成不必要的副反应。

为了避免形成二聚体,提高反应的选择性,采用了酶表面修饰的电极直接电化学还原的方法,比如说利用贝克酵母,*Alcaligenes eutrophus* H16 脱氢酶,心肌黄酶,或者 lipoamide 脱氢酶^[22]。将酶催化反应和电化学耦合的方法在电化学生物传感器领域取得了成功。然而,要把这种耦合应用在生物催化技术中却非常困难。这主要是因为是在电化学反应器中

使用酶涉及到新型的电极-酶反应器的设计,其中酶的稳定性是必须要考虑的重要参数,另一方面,仅仅是那些接近电极表面的酶才具有实际的作用。在一个电化学连续搅拌釜式反应器中,大部分的酶在主体流中,参与催化反应的比例很小,导致反应效率低。相对于酶在溶液中,直接把酶固定在电极表面得到了更好的结果,因此,很多研究致力于把酶固定在电极表面上。除此之外,应用膜技术设计耦合型化学反应器也能够较好的提高转化效率,目前研究的电化学膜反应器有以下两种:第一种电化学和膜反应器是分离开的,在这种情况下,膜反应器能够连续地移走产物,使得酶能够在内部循环。另一种是电化学和酶反应器在同一设备中,也就是通常说的耦合反应器。理论证明,后一种要好一些^[8]。

然而,由于使用纯化酶的方法成本极高,也有研究者在研究非酶修饰电极的辅酶电化学再生方法。通过组氨酸进行电极表面修饰,得到了很好的 NADH 再生系统。组氨酸通过共价连接附着在银电极的表面,形成长期存在的修饰电极。在这个修饰电极上,NAD⁺能够还原成有活性的 NADH。实验表明,在 -0.75V,经过 2h 活性 NADH 转化率为 82%^[22]。

间接电化学方法可以用来避免高的超电势,从而避免在阴极还原 NAD(P)⁺的过程中不希望的副反应。这方面的研究主要集中在寻找合适的介体,从而构建有效的电化学链使电子从电极传递到 NAD⁺。甲基紫晶可以作为阴极和 NAD(P)⁺还原酶之间的介体。然而,甲基紫晶的毒性以及紫晶和 NAD(P)⁺的还原平衡对于辅酶再生是不利的。为了防止毒性泄漏,需要把紫晶化学连接到 L1DH 上^[23]。除此之外,再生反应会被分子氧中止,使得这一方法不能应用在单加氧酶反应中。为此,研究者开发了氢化物转移试剂[Cp * Rh(bpy)(H₂O)]⁺,不但能够将质子还原为氢气,还能够还原一些生物活性结构,如 NAD(P)和 FAD 等,在有氧条件下也能够起到再生作用^[24]。

4 辅酶再生研究的发展方向

综上所述,有效的辅酶再生系统必须包括两个方面:氧化还原力的供给以及它们的有效传递。

从氧化还原力供给来看,酶学方法是通过第二底物/酶或者第二底物/第二酶系统来为辅酶再生提供氧化还原力的,其重点在于选择高效低廉的第二底物、第二酶,且对系统没有影响并且有利于产物分离。对于电化学方法,电极是氧化还原力的供给来源,由于其价格低廉,极具应用潜力。但是电化学方法固有的问题是超电势造成不必要的副反应,使得它的应用受到限制,只能在酶电极等小型化检测方面具有应用前景。如果通过电极修饰,电催化介体开发等能解决上述电化学存在的问题,将对其大规模应用起到推动作用。

从氧化还原力的传递来看,酶法中自由酶方法基本不存在传递阻力,但是需要通过酶的固定化或者膜反应器使酶限制在体系内,使得氧化还原力的利用效率更高。而对于整体细胞的方法,氧化还原力的传递问题是它自身的缺陷,但由于其价格低廉以及对一些特殊反应的适应性,也是辅酶再生

的重要应用方法。电化学方法最需要解决的关键问题就是构建高效的电子传递链,实现氧化还原力的不断转移。

除了常规的辅酶再生系统,研究者还在寻求效率更高,功能更集成的辅酶再生方法:例如,辅酶的再生循环还可以通过在同一种蛋白内表达两种酶活来实现,形成复合功能的融合酶。例如:融合蛋白胞啉-5'-一磷酸(CMP)-硅酸合成酶/ α 2,3-唾液酸转移酶和尿苷二磷酸(UDP)-葡萄糖表异构酶/ α 1,3-半乳糖转移酶^[25,26]。此外,对于微生物转化体系,辅酶往往处于一种精细的平衡状态,仅仅依靠单一细胞内再生途径的改造、强化无法实现大量再生,这就需要借助于其它细胞产生辅酶的体系。日本协和发酵株式会社开发了通过高产ATP和消耗ATP的两种不同休眠细胞之间的耦合实现ATP再生的技术,已在GTP的工业化生产上取得成功^[27,28]。这一思路在今后辅酶再生体系的构建研究中也是一个值得重视和深入研究的方向。笔者所在的研究小组正致力于把这一思路应用于生物制氢领域。发酵型细菌用于生物量转化制取氢气,其关键在于维持体系内高的还原氛围,NADH/NAD比例直接影响发酵过程产氢效率。对于极具潜力的兼性厌氧菌产气肠杆菌,目前已证实其代谢途径与辅酶NADH的供给密切相关。但是仅仅依靠该菌内部的代谢调控,很难打破精细的NADH平衡状态。通过对便于基因操作的外源细菌改造,构建高效的NADH外源再生系统,从而为产氢细菌提供产氢必需的NADH。这一思路的实现,将大幅度提高目前发酵细菌产氢效率,突破发酵生物制氢的瓶颈问题。目前,我们前期的实验显示利用改变细胞通透性制备休眠细胞的方法,有可能实现NADH胞外泄漏和循环^[29]。厌氧-好氧菌在多孔载体内的共固定化技术为双菌或多菌耦合实现NADH外源再生提供了可能^[30]。这些前期研究为构建NADH外源再生体系提供了基础。

为了推动氧化还原酶的生物催化过程的应用发展,亟需开发更为高效的辅酶再生系统。辅酶再生的研究也将随着蛋白质工程、代谢工程、系统生物学等的引入得到新的发展,今后辅酶再生的研究应重视如下几个方面:

1) 寻求广泛适用于工业生物催化过程条件的再生系统,尤其是具有特定功能的新酶的开发。例如通过蛋白质进化策略,开发适用于高有机物浓度的辅酶再生体系等。

2) 进一步研究辅酶再生系统的高效集成技术,以提高其应用价值。这方面的研究热点包括:利用“辅因子工程”,改造细胞内代谢途径,实现以调控辅酶再生为手段的细胞内转化过程;通过不同细胞功能的集成开发细胞间辅酶再生系统;运用现代蛋白质工程和基因工程手段,构建如功能复合的融合酶、多酶细胞外集成等高效再生系统。

3) 扩大辅酶再生应用范围,实现包括NAD(P)H, NAD(P)⁺, ATP, 糖苷, PAPS等辅酶在内的再生系统,应用于更广泛的生物氧化还原体系。

REFERENCES(参考文献)

[1] Sheldon WM. New applications for biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8(2):181-186

- [2] David R Kelly. *Biotechnology: Biotransformations I*. 2nd ed, Berlin: WILEY-VCH, 1998
- [3] Alexander N Glazer, Hiroshi Nikaido. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
- [4] Devaux-Basseguy R, Bergel A, Comtat M. Potential applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases in synthesis: A survey, *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20(4):248-258
- [5] Zhang YB (张玉彬). *Chiral synthesis by biocatalyst(生物催化的手性合成)*. Beijing: Chemical Industry Press, 2001
- [6] Wilfred A van der Donk, Zhao Huimin. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14: 583-589
- [7] Huimin Zhao, Wilfred A van der Donk. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14:421-426
- [8] DelecoulServat K, Basseguy R, Bergel A. Membrane electrochemical reactor (MER): application to NADH regeneration for ADH-catalysed synthesis. *Chemical Engineering Science*, 2002, 57(21): 4633-4642
- [9] Karsten Seelbach, Bettina Riebel, Werner Hummel et al. A novel, efficient regeneration method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters*, 1996, 37(9):1377-1380
- [10] Sheldon W May. Applications of oxidoreductases. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(4):370-375
- [11] Fernanda M Bastos, Tania K Franca, Georgia DC Machado et al. Kinetic modeling of coupled redox enzymatic systems for in situ regeneration of NADPH. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 19-20:459-465
- [12] Jean Cantet, Alain Bergel, Maurice Comtat et al. Coupling of the electroenzymatic reduction of NAD⁺ with a synthesis reaction. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(1):72-79
- [13] Birgit Geueke, Bettina Riebel, Werner Hummel. NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(2):205-211
- [14] Teresa M Bes, Carlos Gomez-Moreno, Jose M Guisan et al. Selective oxidation: stabilization by multipoint attachment of ferredoxin NADP⁺ reductase, an interesting cofactor recycling enzyme. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 1995, 98(3):161-169
- [15] Tadashi Kometani, Hideofumi Yoshii, Ryuichi Matsuno. Large-scale production of chiral alcohols with bakers' yeast. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1996, 1(2):45-52
- [16] Kathryn M Koeller, Chi-Huey Wong. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, 2001, 409: 234-240
- [17] De Felipe FL, Kleerebezem M, De Vos WM et al. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lectococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(15):3804-3808
- [18] Jose Maria Obon, Maria Jesus Almagro, Arturo Manjon et al. Continuous retention of native NADP(H) in an enzyme membrane reactor for gluconate and glutamate production. *Journal of Biotechnology*, 1996, 50(1):27-36

- [19] Kulbe KD, Howaldt MW, Schmidt K *et al.* Rejection and continuous regeneration of the native coenzyme NAD(P)H in a charged ultrafiltration membrane enzyme reactor. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 613:820 - 826
- [20] Iris Schroder, Eberhard Steckhan, Andreas Liese. In situ NAD- regeneration using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonate) as an electron transfer mediator. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2003, 541:109 - 115
- [21] Tayhas G, Palmore R, Bertsehy H, Bergens SH, Whitesides GM. Methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependent dehydrogenases as catalysts; application of an electroenzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1998, 443(1):155 - 161
- [22] Yi-Tao Long, Hong-Yuan Chen. Electrochemical regeneration of coenzyme NADH on a histidine modified silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1997, 440:239 - 242
- [23] Mihaela Draganoiu Leonida *et al.* Co-Electropolymerization of a Viologen Oligomer and Lipoamide Dehydrogenase on an Electrode Surface: Application to Cofactor Regeneration. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 1996, 6 (14):1663 - 1666
- [24] Hollmann F, Witholt B, Schmid A *et al.* [Cp * Rh (bpy) (H₂O)]²⁺: a versatile tool for efficient and non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin coenzymes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 19 - 20:167 - 176
- [25] Gilbert M, Bayer R, Cunningham AM *et al.* The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion. *Nature Biotechnology*, 1998, 16:769 - 772
- [26] Wang J-Q, Chen X, Zhang W *et al.* Enhanced inhibition of human anti-gal antibody binding to mammalian cells by synthetic a-gal epitope polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(36):8174 - 8181
- [27] Fujio T, Maruyama A, Aoyama Y *et al.* Production of 5'-GMP from glucose by coupling reaction between *Corynebacterium ammoniagenes* and Self-cloned *Escherichia coli*, *Seibutsu-kogaku Shi*, 1999, 77:104 - 112 (Japanese)
- [28] Fujio T, Maruyama A, Mori H. New production methods for useful substance using ATP regeneration system. *Bioscience and Industry*, 1998, 56:7373 - 742 (Japanese)
- [29] Tanaka T, Xing X H, Matsumoto K *et al.* Preparation and characteristics of resting cells of bioluminescent *Pseudomonas putida* BLU. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, 12(1):23 - 30
- [30] Xing XH, Jun BH, Yanagida M *et al.* Effect of C/N values on microbial simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous substances in wastewater by single continuous-flow fluidized-bed bioreactor containing porous carrier particles. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 5(1): 29 - 37

Research Progress in Cofactor Regeneration Systems

ZHANG Chong XING Xin-Hui*

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Cofactor regeneration system is the key step for the biocatalysis and biotransformation of chemicals by oxidoreductases. Among the methods developed for the cofactor regeneration, two of the most important methods, enzymatic regeneration and electrochemical regeneration, were reviewed in this paper. In the enzymatic regeneration of NAD(P)H or NAD(P), development of an efficient enzymatic system is the focus of researches. For use of free enzymes in the cofactor regeneration, finding new enzymes and the functionally coupling of the enzymatic reactions are important. While for using the whole cells in the enzymatic regeneration system, reaction engineering such as the use of membrane reactors is also indispensable. Efficiency of the electrochemical regeneration of the cofactors is closely dependent upon the electrode modification and selection of the electron mediators. Moreover, perspectives of new regenerating methods such as fusion proteins with multi-functionality, "cofactor engineering" by the metabolic manipulation of whole cells, and multi-species microbial coupling system were also discussed. With the progress of microbial genomics, proteomics, metabolic engineering and systems biology, the cofactor regeneration will achieve breakthroughs and become a feasible tool for the industrial application.

Key words cofactor regeneration, electrochemistry, enzyme, industrial biotechnology, oxidoreductase

Received: 04-20-2004

This work was supported by National Basic Research Program (973 Plan) (No. 2003CB716003).

* Corresponding author. Tel: 86-10-6279-4771; Fax: 86-10-6277-0304; E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn