

# 甲酸脱氢酶用于辅酶 NADH 再生的研究进展

黄志华<sup>1,2</sup>, 刘铭<sup>1</sup>, 王宝光<sup>1</sup>, 张延平<sup>1</sup>, 曹竹安<sup>1</sup>

(1. 清华大学化学工程系生物化工研究所, 北京 100084; 2. 三明学院化学与生物工程系, 福建 三明 365004)

**摘要:** NADH 依赖型氧化还原酶广泛应用于精细化学品和手性化合物的生物合成, 其中辅酶 NADH 作为还原当量起着关键的作用, NADH 的再生关系到生物氧化还原过程能否进行. 甲酸脱氢酶在辅酶 NADH 再生中的应用是目前代谢工程领域研究的热点之一. 本工作回顾了甲酸脱氢酶的来源和氨基酸序列、酶的理化性质和催化机理等方面的研究进展, 从化学稳定性、热稳定性和成本等方面阐述了甲酸脱氢酶在辅酶再生系统中的应用, 讨论了甲酸脱氢酶用于辅酶再生的代谢工程平台的发展趋势, 并对研究发展方向提出了一些设想.

**关键词:** 甲酸脱氢酶; 辅酶(NADH)再生; 氧化还原反应

**中图分类号:** TQ923 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)06-1011-06

## 1 前言

在酶的六大类型中, 30%~35%为氧化还原酶. 氧化还原酶在催化制备手性醇、羧基酸、氨基酸等方面具有明显的优势, 其应用越来越受到重视. 而在氧化还原酶所催化的反应中, 合成产物的同时会消耗一定量的辅酶, 约 80%的反应需要尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD, NADH)作为辅酶, 10%的反应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<sup>[1]</sup>. 因此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. 为了解决辅酶再生这一问题, 已经提出了一系列的方法, 包括酶学、光化学和电化学等再生系统<sup>[2]</sup>, 其中酶法再生系统由于具有反应速率快、选择性高、再生体系与合成体系兼容性好、过程易于监控等优点, 受到了广泛重视. 在酶法再生系统中用的最多的酶是脱氢酶, 其次有氧化酶、氢化酶等.

近年来, 甲酸脱氢酶(Formate Dehydrogenase, FDH)在辅酶再生中的应用已成为辅酶酶法再生研究领域的热点之一. 甲酸/甲酸脱氢酶体系是最成功的再生系统, 并已应用于工业生产. 其优势在于反应不可逆, 甲酸价格低廉且很多酶对此有很高的耐受性. 此反应只产生一种副产物—CO<sub>2</sub>, 而 CO<sub>2</sub> 对任何酶的活性均没有任何影响, 且反应完全, 同时 CO<sub>2</sub> 作为一种气体, 很容易从反应体系中逃逸出来. Kula 等因在 2002 年发现这一现象而被授予德国未来奖<sup>[3]</sup>. 本工作阐述了甲酸脱氢酶在辅

酶再生方面的应用研究进展, 探讨了未来的发展方向.

## 2 甲酸脱氢酶的研究进展

甲酸脱氢酶(FDH)属于 D-2-羧基酸脱氢酶类<sup>[4]</sup>, 根据 4 级结构、辅基的构象和类型以及底物特异性的区别, 分为几种不同的类型, 其中很重要的一类就是 NAD<sup>+</sup> 依赖型的甲酸脱氢酶(EC 1.2.1.2), 它可以将甲酸氧化为 CO<sub>2</sub>, 同时将 NAD<sup>+</sup> 还原为 NADH(如图 1 所示). 该类型的甲酸脱氢酶由 2 个相同的亚基组成, 不包含金属离子和辅基, 并且对甲酸和 NAD<sup>+</sup> 具有高度的专一性. NAD<sup>+</sup> 依赖型 FDH 催化过程的一个显著特征是来自底物的氢离子直接转移到 NAD<sup>+</sup> 的烟碱 C4 原子上, 无需酸碱催化步骤.

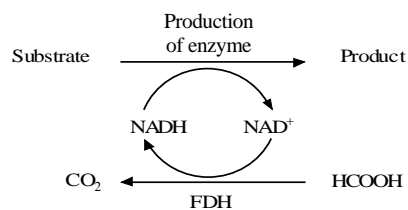


图 1 甲酸/FDH 辅酶再生系统

Fig.1 Formate/FDH cofactor regeneration system

### 2.1 甲酸脱氢酶的来源和氨基酸序列

所有的甲基营养型微生物中都含有甲酸脱氢酶, 将甲酸分解为 CO<sub>2</sub> 是这些微生物所需能量的主要来源. 一方面 NAD<sup>+</sup> 依赖型的 FDH 可以在所有利用甲醇的酵母中获得, 如 *Candida*, *Pichia* 和 *Hansenula* 属中的许多菌株<sup>[5-7]</sup>; 但另一方面这种酶在细菌中分布并不广泛, 细菌中大多数可以氧化甲酸的酶通常是丙酮酸脱氢酶复

收稿日期: 2005-12-07, 修回日期: 2006-02-08

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2003CB716007)

作者简介: 黄志华(1964-), 女, 福建省平和县人, 学士, 副教授, 生物化工专业, E-mail: hzh917@163.com; 曹竹安, 通讯联系人, Tel: 010-62785514, E-mail: cza-dce@mail.tsinghua.edu.cn.

合体的组成部分,并且在活性中心包含硒氨酸、钨离子或者钼离子<sup>[8]</sup>。直到20世纪90年代中期,NAD<sup>+</sup>依赖型FDH才从3种细菌中获得,它们分别是 *Pseudomonas* sp. 101<sup>[9]</sup>, *Moraxella* sp. C2 (EMBL accession Y13245)以及 *Mycobacterium vaccae* N10<sup>[10]</sup>。现在已经从13种细菌 (*Paracoccus* sp. 12-A<sup>[11]</sup>, *Ancylobacter aquaticus*<sup>[12]</sup>, *Thiobacillus* sp. KNK65MA<sup>[13]</sup>等)、5种酵母菌 (*C. boidinii*<sup>[14-16]</sup>, *C. methylica*<sup>[17]</sup>, *Pichia pastoris*<sup>[18]</sup>等)、6种真菌 (*A. nidulans*<sup>[19]</sup>, *N. crassa*<sup>[20]</sup>等)中获得了多种FDH,并分析了FDH的氨基酸序列。此外,甲酸脱氢酶还存在于一些高等真核生物和高等植物中<sup>[21]</sup>。

研究发现,同种类FDH的绝对同源性大于80%,即使不同种类的FDH同源性也在50%~55%之间<sup>[13,22]</sup>。现在已知的有36个FDH全序列,以及25个FDH部分序列,这些FDH的来源不尽相同。对比分析发现,保守的氨基酸残基有71个,而FDH的平均总长度为365个残基,这就意味着20%的氨基酸残基都是保守序列。对 *Pseudomonas* sp. 101中FDH的保守残基作空间位置分析后发现,保守残基的功能是不同的。有些保守残基(如离子对 Lys2-Asp89)起着稳定亚基结构的作用,有些 (Arg163, Asn164, Trp177, Ala180, Asp188)则涉及亚基之间的关联作用,而只有很少的残基 [Pro97, Phe98, Ile122, Asn146, (Ala/Gly)198, Gly200, Gly203, Arg284, Gln313 和 His332]参与催化过程。此外,需要注意的是

Asp308残基,因为它的羧基和NAD<sup>+</sup>尼克酰胺的氨基能够形成氢键,而FDH的第255个残基Cys255则可以与NAD<sup>+</sup>的腺嘌呤发生作用<sup>[5,23]</sup>。

研究人员对酵母和细菌中的FDH进行了比较,发现细菌中的FDH更加稳定,活性也更高。*Pseudomonas* sp. 101中的FDH是迄今所知的最稳定的天然FDH<sup>[9]</sup>,后来研究人员将更多精力集中于细菌中FDH的研究和应用。

## 2.2 NAD<sup>+</sup>依赖型甲酸脱氢酶的理化性质

NAD<sup>+</sup>依赖型甲酸脱氢酶的分子量大都在70~100 kDa之间,具有相对较低的酶活和较低的甲酸离子亲和力,在中性pH附近拥有相对较宽的最适pH值范围(表1)。大多数NAD<sup>+</sup>依赖型FDH在空气中都是稳定的,但是 *Pseudomonas oxalaticus* 中的FDH在空气中不够稳定,因为它的结构和成分都比较复杂,并且大量的含硫蛋白对氧气很敏感。大部分FDH具有相似的热稳定性,在55~60℃之间迅速失活。不同来源的甲酸脱氢酶的理化性质比较见表1。

## 2.3 甲酸脱氢酶催化机制和动力学参数

研究发现,所有真核生物的FDH都以顺序反应机制将甲酸氧化<sup>[5,27,30,31]</sup>,如酵母菌中的FDH所采用的就是双-双式顺序(Bi-Bi ordered)机制。而细菌中的FDH则通过随机反应机制进行催化反应,在自由酶与双复合物FDH-甲酸、FDH-NAD<sup>+</sup>之间存在快速的平衡关系。

表1 NAD<sup>+</sup>依赖型甲酸脱氢酶的物理化学性质  
Table 1 The physicochemical properties of NAD<sup>+</sup>-dependent FDHs

Source	Subunit (kDa)	Optimum pH	Temperature stability (°C)	Reference
Bacteria	<i>Pseudomonas oxalaticus</i>	2×100, 2×59	7.5	[24]
	<i>Pseudomonas</i> sp. 101	2×44	6.0~9.0	[25]
	<i>Mollaxella</i> sp. C-1	2×48	6.0~9.0	[26]
Yeasts	<i>Candida boidinii</i>	2×36	6.5~8.5	[27]
	<i>Candida methylica</i>	2×46	6.0~9.0	[28]
	<i>Hansenula polymorpha</i>	2×40	7.0	[15]
	<i>Pichia pastries</i> NRRL-Y-7556	2×47	6.5~7.5	[29]
Fung	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> CS105	2×42	6.5	[29]

表2 不同来源的NAD<sup>+</sup>-依赖型FDH的反应机制和动力学参数  
Table 2 Kinetic properties of formate dehydrogenases from various sources

Enzyme	Specific activity (U/mg)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ for substrate (mmol/L)	$K_m$ for NAD <sup>+</sup> (μmol/L)	Kinetic mechanism	Reference
Reaction with formate						
<i>Pseudomonas</i> sp.101, native	10	7.3	15	80	Bi-Bi random	[9, 32]
<i>Pseudomonas</i> sp. 101, recombinant of wild type	10	7.3	6.5	60	Bi-Bi random	[9, 32]
<i>Pseudomonas</i> sp. 101, mutant	10	7.3	6.0	35	Bi-Bi random	[9, 32]
<i>M. vaccae</i> N10, recombinant	10	7.3	6.0	89	Bi-Bi random	[10]
<i>C. methylica</i> , recombinant	2.1	1.4	-	55	Bi-Bi ordered	[17]
<i>C. boidinii</i> , native	6.0	3.6	5.6	45	Bi-Bi ordered	[15]
<i>C. boidinii</i> , recombinant of wild type	6.3	3.7	5.9	37	Bi-Bi ordered	[15]
<i>S. cerevisiae</i> , recombinant	10	6.5	5.5	36	Bi-Bi ordered	[31, 33]
Reaction with thioformate						
<i>Pseudomonas</i> sp.101, native	Reaction is absent, the competitive inhibitor for formate, $K_i = 6.5$ mmol/L					[7]
<i>H. polymorpha</i> , native (37 °C)	0.92	0.61	1.8	-		[7]
<i>C. boidinii</i> , native	1.17	0.78	2.0	-		[7]

表 2 总结了不同来源的 FDH 相关动力学参数. 从表可以看出: (1) 所有的 FDH 具有相似的甲酸米氏常数 (3~10 mmol/L) 和  $\text{NAD}^+$  米氏常数 (35~90  $\mu\text{mol/L}$ ), 而重组后 FDH 的相关米氏常数略有不同; (2) 细菌中 FDH 的酶活大约是酵母菌 FDH 的 1.7 倍, 由于细菌 FDH 的分子量高出酵母 FDH 约 10%, 所以反映在转化数 ( $k_{\text{cat}}$ ) 上就是 2 倍的差距. 面包酵母 (Bakery yeast) 中的 FDH 是特例, 它的反应速率常数较高, 但由于其热稳定性差, 所以应用前景不明朗; (3) 所有的 FDH 都具有很高的  $\text{NAD}^+$  特异性, 并且不能与  $\text{NADP}^+$  反应. 而酵母 FDH 比细菌 FDH 具有更高的  $\text{NAD}^+$  特异性; (4) 细菌和酵母 FDH 具有不同的底物抑制动力学特征. 硫甲酸是 FDH 的竞争性抑制剂, 并且它的抑制常数与甲酸的米氏常数

相近, 如果用硫甲酸替代甲酸作为底物, 细菌 FDH 就不能进行催化反应, 但酵母 FDH 仍然能与硫甲酸反应.

为了改变 FDH 的辅酶特异性, 使 FDH 可以利用  $\text{NADP}^+$ , 以创建廉价而高效的  $\text{NADPH}$  再生系统, 到目前为止只有 3 个成功的研究案例将 FDH 的辅酶特异性从  $\text{NAD}^+$  改变为  $\text{NADP}^+$  (如表 3 所示). 第 1 个  $\text{NADP}^+$  依赖型 FDH 来自于改造后的 *Pseudomonas* sp. 101. 在对 *C. methylica* 中的 FDH 进行 Asp195Ser 替换之后, 其对  $\text{NADP}^+$  的亲合力增加了 10000 倍, 而对面包酵母 FDH 进行了 Asp196Ala/Tyr197Arg 双替换之后, FDH 对  $\text{NADP}^+$  的亲合力变为对  $\text{NAD}^+$  亲和力的 2.4 倍. 研究发现, 对辅酶结合域进行突变可以增加  $\text{NADP}^+$  的结合, 而不影响酶活性中心的结构.

表 3 甲酸脱氢酶突变体的动力学特征

Table 3 Kinetic properties of recombinant wild-type and mutant FDHs from yeasts *S. cerevisiae* (SceFDH), *C. methylica* (CmeFDH) and *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH)

Enzyme	$K_m, \text{NAD}^+$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$k_{\text{cat}}$ with $\text{NAD}^+$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m, \text{NADP}^+$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$k_{\text{cat}}$ with $\text{NADP}^+$ ( $\text{s}^{-1}$ )	Reference
CmeFDH (wild type)	55±4 (0.2 mol/L formate)	1.4±0.1	—	—	[34]
Mutant CmeFDH D195S	4700±300 (0.2 mol/L formate)	1.6±0.1	—	—	[34]
SceFDH (wild type)	36±5 (0.25 mol/L formate)	6.5±0.4	—	—	[33]
Mutant SceFDH D196A/Y197R	7600±800 (0.25 mol/L formate)	0.095±0.01 (0.25 mol/L formate)	4500±500 (0.25 mol/L formate)	0.13±0.01 (0.25 mol/L formate)	[33]
PseFDH (wild type)	60±5 (0.3 mol/L formate)	10.0±0.6	>0.4 mol/L	—	[33]
Mutant $\text{NADP}^+$ -dependent PseFDH	1000±150 (0.3 mol/L formate)	5.0±0.4	150±25 (0.3 mol/L formate)	2.5±0.15	[33]

### 3 甲酸脱氢酶在辅酶再生系统的应用

甲酸脱氢酶主要应用于辅酶 NADH 的酶耦联法再生系统中, 所谓的酶耦联就是利用 2 个平行的氧化还原反应酶系统, 1 个酶催化底物转化, 另 1 个酶则催化辅酶 NADH 循环再生. 为了达到最佳效果, 2 个酶的底物应相对独立, 以避免竞争同一酶的活性中心. 甲酸/甲酸脱氢酶再生体系具有诸多优点: (1) FDH 容易得到, 且适宜的 pH 范围宽, 易于实现再生反应与合成反应的有效耦合; (2) 甲酸是最廉价的氢源之一; (3) 甲酸在 FDH 作用下转化为  $\text{CO}_2$ , 可直接从产物中分离出去, 使反应接近于不可逆过程; (4) 甲酸的存在并不会影响体系中另一氧化还原酶的活性. 而甲酸脱氢酶也有一些缺点, 其酶活相对较低, 细菌 FDH 的酶活在 10 U/mg 左右, 而酵母 FDH 的酶活更低, 大约在 6~7 U/mg. 并且甲酸脱氢酶的生产成本高, 对有机溶剂敏感.

#### 3.1 辅酶再生系统

20 世纪 80 年代研究人员就提出利用 FDH 进行辅酶再生, 但是由于从自然菌株中生产甲酸脱氢酶的成本高昂, 大大限制了它的实际应用. 在工业界只有一个成

功的例子, 德国 Degussa 公司利用 *Candida boidinii* 中的 FDH 大规模生产 L-亮氨酸. 该工业规模的辅酶再生系统采用了持续超滤膜(UF)反应器, 由于 FDH 和辅酶的分子量都大于超滤膜的截留分子量, 所以都被保留了下来<sup>[35]</sup>. 而甲酸脱氢酶对有机溶剂敏感的缺点也限制了它的应用, 但该困难现在已有了解决方法, 可以根据 *Rhodococcus erythropolis* 中的 ADH(乙醇脱氢酶)对酮的不对称还原作用, 采用含有 10%~20% ( $\varphi$ ) 正己烷的两阶段混合剂. FDH 在上述条件下反应 65 h 后的稳定性仍然很高 (>90%), 而基质的浓度则上升到 100 mmol/L, 从而可以提高单位体积的生产效率<sup>[36,37]</sup>. 采用两阶段乳化不仅可以利用疏水的基质和产物, 而且可以降低产物抑制并利于产物的分离. 在另一项研究中, 对 FDH 的半胱氨酸残基进行了突变, 可以提高 FDH 在生物转化条件下的稳定性<sup>[38]</sup>.

#### 3.2 甲酸脱氢酶的化学稳定性

生产过程中酶的失活与活性中心关键基团的化学修饰及热变性有关. 对于 FDH, 由于空气中氧或基质中其他化学物质的作用, 半胱氨酸的氧化使 FDH 失去活性<sup>[15]</sup>. 针对这一点, 研究者们对半胱氨酸残基进行定点

突变,从而提高 FDH 的化学稳定性. *Pseudomonas* sp. 101 中 FDH 的失活主要是因为 Cys255 残基被氧化或修饰所引起的<sup>[39]</sup>,大多数细菌 FDH 的 Cys255 残基都位于辅酶结合域,与 NAD<sup>+</sup>分子的腺嘌呤基团相关联,对保持细菌 FDH 的化学稳定性起着关键的作用. Tishkov 等<sup>[40]</sup>将 *Pseudomonas* sp. 101 中的 FDH 进行了 Cys255Ser 和 Cys255Met 的定点突变,突变后 FDH 的化学稳定性至少比野生重组 FDH 提高了 2 个数量级,但突变后却削弱了与辅酶 NAD<sup>+</sup>的结合. 随后,又进行了 Cys255Ala 的定点突变<sup>[7]</sup>,非常成功,突变后 FDH 的动力学性质与野生 FDH 保持一致. FDH 分子还含有其他 Cys 残基,虽然它们的作用比 Cys255 弱一些,但也可以被修饰剂所修饰. 在将 Cys255 替换为 Ala 的同时,将 Cys145 和 Cys354 也替换为 Ala,突变后 FDH 的化学稳定性比前提高了 1000 倍<sup>[7]</sup>.

### 3.3 甲酸脱氢酶的热稳定性

在对 FDH 的 Cys 残基进行突变后,FDH 的热稳定性却降低了. 对于 *Pseudomonas* sp. 101 中的 FDH, Cys255Ala 和 Cys354Ser 突变体相对野生 FDH 的热失活速率分别提高了 4 和 2 倍. *C. boidinii* 的 FDH 突变后热稳定性下降得更多, Cys23Ser 和 Cys262Val 突变体的热失活速率分别提高了 6 和 19 倍,而复合突变体 C23S/C262V 和 C23S/C262A 的热失活速率则分别提高了 100 和 33 倍<sup>[15]</sup>.

为了提高 *Pseudomonas* sp. 101 中 FDH 的热稳定性,同样使用定点突变的方法. 根据 $\alpha$ 螺旋疏水处理静电作用和多肽的优化可以提高蛋白稳定性的原理,选择突变位点进行突变,最后选择 7 个突变位点,这 7 个位点对 FDH 的动力学性质都没有影响. 该多位点突变体的化学和热稳定性都得到了提高,其中热稳定性是野生酶的 10 倍. 该突变体在 45℃ 的条件下保温 3 个月仍然保持良好的活性,而野生 FDH 在 60 d 后就完全失去了活性<sup>[41]</sup>.

### 3.4 FDH 的生产成本

基因工程方法可以显著地提高 FDH 的稳定性,并且可以开发高效的培养和纯化过程,从而降低 FDH 的成本. Tishkov 等<sup>[42]</sup>构建了一株重组菌 *E. coli* 来生产 *Pseudomonas* sp. 101 的 FDH,该重组菌 50%~55% 的表达蛋白都是可溶的活性 FDH. 在 400 L 的发酵罐中,FDH 的生产效率可以达到 25000 U/(L·d). 另一方面,重组菌的高效表达使后续的纯化过程中可以处理相对较少的发酵液,而 FDH 热稳定性的提高使热处理成为纯化过程的有效分离步骤. 对上述发酵液的细胞破碎提取物在 58~60℃ 下处理 15~20 min,就可以将酶的纯度从

50% 提高到 80%~85%,这样的纯度对于 FDH 的应用已经足够了. 现在 FDH 的生产成本大约在 0.010~0.015 \$/U,已经比以前降低了 10 倍之多,而在 L-亮氨酸的工业化生产中,FDH 的成本只占总成本的 5%~8%.

## 4 FDH 用于辅酶再生的代谢工程平台技术展望

代谢工程是一种分析并利用代谢过程的方法,通过优化或改变生物细胞中的代谢网络和表达调控网络,达到提高代谢产物的产量或合成新的化合物的目的. 生物氧化还原是生物催化中非常重要的一类反应, NADH 作为还原当量起着关键的作用, NADH 的再生关系到生物氧化还原过程能否进行. 甲酸脱氢酶在辅酶 NADH 再生方面的应用可以作为一种平台技术,有望实现更多生物氧化还原过程的工业化.

辅酶再生的研究将随着蛋白质工程、代谢工程、基因工程和系统生物学等的发展而得到新的发展,今后甲酸/甲酸脱氢酶辅酶再生系统的研究应重视如下几个方面,将其作为平台技术来发展:

(1) 通过蛋白质进化策略进行定向进化,提高 FDH 的热稳定性、化学稳定性和操作稳定性,使 FDH 适用于有机溶剂催化体系、高温反应体系等更适于工业化的反应模式.

(2) 运用基因工程手段实现 FDH 的高效表达,提高 FDH 的生产效率,降低生产成本,促进工业化的进程,实现 FDH 的广泛应用.

(3) 综合运用蛋白质工程、代谢工程、基因工程以及系统生物学技术,扩大辅酶再生的应用范围,实现包括 NADH, NAD(P)H, NAD(P)<sup>+</sup>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.

#### 参考文献:

- [1] Sheldon W M. New Applications for Biocatalysts [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997, 8(2): 181-186.
- [2] 张玉彬. 生物催化的手性合成 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 170-176.
- [3] Wichmann R, Vasic-Racki D. Technology Transfer in Biotechnology, from Lab to Industry to Production [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2005. 225-260.
- [4] Mika Jormakka, Bernadette Byme, So Lwata. Formate Dehydrogenase — A Versatile Enzyme in Changing Environments [J]. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, 13: 418-423.
- [5] Popov V O, Lamzin V S. NAD<sup>+</sup>-dependent Formate Dehydrogenase [J]. *Biochem. J.*, 1994, 301: 625-643.
- [6] Popov V O, Tishkov V I. In Protein Structures: Kaleidoscope of Structural Properties and Functions [A]. Uversky V N. *Molecular Anatomy and Physiology of Proteins* [C]. Kerala: Research Signpost, 2003. 441-473.

- [7] Tiskkov V I, Popov V O. Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, 69: 1252–1267.
- [8] Khangulov S V, Gladyshev V N, Dismukes G C. Selenium-containing Formate Dehydrogenase H from *Escherichia coli*: A Molybdopterin Enzyme that Catalyzes Formate Oxidation without Oxygen Transfer [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(10): 3518–3528.
- [9] Tishkov V I, Galkin A G, Egorov A M. NAD-dependent Formate Dehydrogenase of Methylophilic Bacteria *Pseudomonas* sp. 101: Cloning, Expression, and Study of the Genetic Structure [J]. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1991, 317: 345–348.
- [10] Galkin A, Kulakova L, Tishkov V, et al. Cloning of Formate Dehydrogenase Gene from a Methanol-utilizing Bacterium *Mycobacterium vaccae* N10 [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 44: 479–483.
- [11] Shinoda T, Satoh T, Mineki S, et al. Cloning, Nucleotide Sequencing, and Expression in *Escherichia coli* of the Gene for Formate Dehydrogenase of *Paracoccus* sp. 12-A, a Formate-assimilating Bacterium [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66: 271–276.
- [12] Nanba H, Takaoka Y, Hasegawa J. Purification and Characterization of Formate Dehydrogenase from *Ancylobacter aquaticus* Strain KNK607M, and Cloning of the Gene [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, 67: 720–728.
- [13] Nanba H, Takaoka Y, Hasegawa J. Purification and Characterization of an Alpha-Haloketone-resistant Formate Dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. Strain KNK65MA, and Cloning of the Gene [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, 67: 2145–2153.
- [14] Sakai Y, Murdanoto A P, Konishi T, et al. Regulation of the Formate Dehydrogenase Gene, FDH1, in the Methylophilic Yeast *Candida boidinii* and Growth Characteristics of an FDH1-disrupted Strain on Methanol, Methylamine and Choline [J]. *J. Bacteriol.*, 1997, 179: 4480–4485.
- [15] Slusarczyk H, Felber S, Kula M R, et al. Stabilization of NAD-dependent Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii* by Site-directed Mutagenesis of Cysteine Residues [J]. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267: 1280–1289.
- [16] Labrou N E, Rigden D J. Active-site Characterization of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase [J]. *Biochem. J.*, 2001, 354: 455–463.
- [17] Allen S J, Holbrook J J. Isolation, Sequence and Overexpression of the Gene Encoding NAD-dependent Formate Dehydrogenase from the Methylophilic Yeast *Candida methylica* [J]. *Gene*, 1995, 162: 99–104.
- [18] Goldberg S L, Cino P M, Patel R N, et al. *Pichia Pastoris* Formate Dehydrogenase and Uses Therefore [P]. US Pat.: 20040038237 AL, 2004-02-26.
- [19] Saleeba J A, Cobbett C S, Hynes M J. Characterization of the *AmdA*-regulated *AciA* Gene of *Aspergillus nidulans* [J]. *Mol. Gen. Genet.*, 1992, 235: 349–358.
- [20] Chow C M, Raj Bhandary U L. Developmental Regulation of the Gene for Formate Dehydrogenase in *Neurospora crassa* [J]. *J. Bacteriol.*, 1993, 175: 3703–3709.
- [21] Davison D C. Studies on Plant Formic Dehydrogenase [J]. *Biochem. J.*, 1951, 49: 520–526.
- [22] Beja O, Aravind L, Koonin E V, et al. Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea [J]. *Science*, 2000, 289(5486): 1902–1906.
- [23] Lamzin V S, Dauter Z, Popov V O. High Resolution Structures of Holo and Apo Formate Dehydrogenase [J]. *J. Mol. Biol.*, 1994, 236(3): 759–785.
- [24] Muller U, Willnow P, Ruschig U, et al. Formate Dehydrogenase from *Pseudomonas oxalaticus* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1978, 83: 485–498.
- [25] Egorov A M, Avirova T V, Dicov M M, et al. NAD-dependent Formate Dehydrogenase from Methylophilic Bacterium, Strain 1-Purification and Characterization [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1979, 99: 569–576.
- [26] Asano Y, Sekigawa T, Inukai H, et al. Purification and Properties of Formate Dehydrogenase from *Moraxella* sp. Strain C-1 [J]. *J. Bacteriol.*, 1988, 170: 3189–3193.
- [27] Schutte H, Flossdorf J, Sahn H, et al. Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1976, 62: 151–160.
- [28] Avilova T V, Egorova O A, Ioanesyan L S, et al. Biosynthesis, Isolation and Properties of NAD-dependent Formate Dehydrogenase from the Yeast *Candida methylica* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1985, 152: 657–662.
- [29] Tomoki Watanabe, Takefumi Hattori, Sabrina Tengku, et al. Purification and Characterization of NAD-dependent Formate Dehydrogenase from the White-rot Fungus *Ceriporiopsis subvermispora* and a Possible Role of the Enzyme in Oxalate Metabolism [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 37: 68–75.
- [30] Peacock D, Boulter D. Kinetic Studies of Formate Dehydrogenase [J]. *Biochem. J.*, 1970, 120: 763–769.
- [31] Serov A E, Popova A S, Tishov V I. The Kinetic Mechanism of Formate Dehydrogenase from Bakery Yeast [J]. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2002, 382: 26–30.
- [32] Iida M, Kitamura-Kimura K, Maeda H, et al. Purification and Characterization of a NAD<sup>+</sup>-dependent Formate Dehydrogenase Produced by *Paracoccus* sp. [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992, 56: 1966–1970.
- [33] Serov A E, Popova A S, Fedorchuk V V, et al. Engineering of Coenzyme Specificity of Formate Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochem. J.*, 2002, 367: 841–847.
- [34] Gul-Karaguler N, Sessions R B, Clarke A R, et al. A Single Mutation in the NAD-specific Formate Dehydrogenase from *Candida methylica* Allows the Enzyme to Use NADP [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2001, 23: 283–287.
- [35] Wilfred A, Van der Donk, Zhao H M. Regeneration of Cofactors for Use in Biocatalysis [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, 14: 583–589.
- [36] Groeger H, Hummel W, Buchholz S, et al. Practical Asymmetric Enzymatic Reduction through Discovery of a Dehydrogenase Compatible Biphasic Reaction Media [J]. *Org. Lett.*, 2003, 5: 173–176.
- [37] Schmid A, Vereyken I, Held M, et al. Preparative Regio- and Chemoselective Functionalization of Hydrocarbons Catalyzed by Cell-free Preparations of 2-Hydroxybiphenyl 3-Monooxygenase [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, 2001, 11: 455–462.
- [38] Slusarczyk H, Felber S, Kula M-R, et al. Stabilization of NAD-dependent Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii* by Site-directed Mutagenesis of Cysteine Residues [J]. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267: 1280–1289.
- [39] Popov V O, Shumilin I A, Ustinnikova T B, et al. NAD-dependent Formate Dehydrogenase from Methylophilic Bacteria *Pseudomonas* sp. 101 — I. Amino Acid Sequence [J]. *Bioorg. Khim.*, 1990, 16: 324–335.

- [40] Tishkov V I, Galkin A G, Marchenko G N, et al. Catalytic Properties and Stability of a *Pseudomonas* sp. 101 Formate Dehydrogenase Mutants Containing Cys-255-ser and Cys-255-met Replacements [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 192: 976–981.
- [41] Serov A E, Odintzeva E R, Uporov I V. Use of Ramachandran Plot for Increasing Thermal Stability of Bacterial Formate Dehydrogenase [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, 70(7): 804–808.
- [42] Tishkov V I, Galkin A G, Fedorchuk V V, et al. Pilot Scale Production and Isolation of Recombinant NAD<sup>+</sup>- and NADP<sup>+</sup>-specific Formate Dehydrogenases [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 64: 187–193.

## Formate Dehydrogenase and Its Application in Cofactor NADH Regeneration

HUANG Zhi-hua<sup>1,2</sup>, LIU Ming<sup>1</sup>, WANG Bao-guang<sup>1</sup>, ZHANG Yan-ping<sup>1</sup>, CAO Zhu-an<sup>1</sup>

(1. Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;  
2. Department of Chemistry and Biology Engineering, Sanming College, Sanming, Fujian 365004, China)

**Abstract:** NADH-dependent oxidoreductases are valuable tools for the biological synthesis of fine chemicals and chiral compounds. As the reducing equivalent, cofactor NADH plays a critical role in those reactions. Due to the high cost of the NADH cofactors, in situ NADH regeneration is required for preparative applications. NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase (FDH) is an abundant enzyme that plays an important role in energy supply of methylotrophic microorganisms. FDH captures increasing attention in recent years, and is widely used in enzymatic syntheses of chemical compounds as a versatile biocatalyst for NADH regeneration consumed in the main reactions. This review covers the latest developments in cloning genes of FDH from various sources, studies of its catalytic mechanism and physiological role, and its application for NADH regeneration from the following aspects: chemical stability, thermal stability and cost. Future development of FDH used as NADH regeneration platform is also illustrated.

**Key words:** formate dehydrogenase (FDH); cofactor NADH regeneration; oxidation–reduction reaction