(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109652402 A
(43)申请公布日 2019.04.19

(21)申请号 201910049939.X

(22)申请日 2019.01.18

(71)申请人 浙江工业大学
地址 310014 浙江省杭州市下城区朝晖六区

(72)发明人 於建明 汤育炜 吴朦 王佳哲 宋永泉 胡俊 成卓韦

(74)专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司 33212
代理人 金祺

(51)Int.Cl.
C12N 11/14(2006.01)
C12N 11/10(2006.01)
C12N 11/04(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 9/14(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)

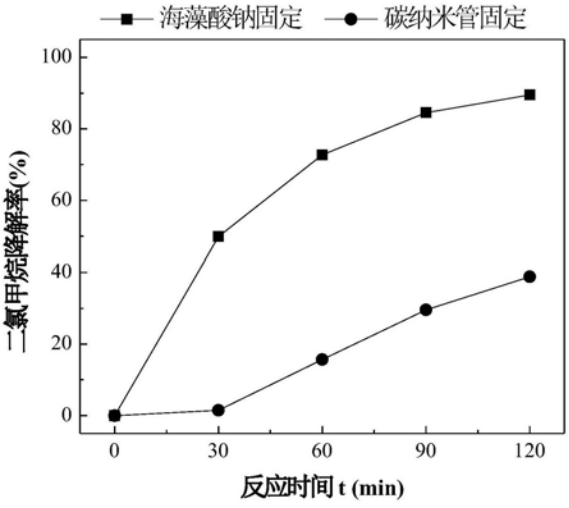
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽再生方法及酶电极

(57)摘要

本发明公开了一种酶电极,为按照如下步骤制备而得:利用DCM降解菌MethylobacteriumH13制备获得重组工程菌,经诱导培养表达和纯化,得DCM脱卤酶纯酶液;将DCM脱卤酶纯酶液与海藻酸钠进行混合,得包埋料;将包埋料涂抹于电极基体表面,然后经$Ca(NO_3)_2$固定等,得酶电极。本发明还同时提供了利用上述酶电极进行的基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽GSH再生方法,包括在阴极电解槽注入含DCM废水、作为辅酶的还原型谷胱甘肽GSH,进行恒定电流电解。本发明利用电化学技术,以酶电极为媒介,为辅酶GSH再生提供充足的电子,促进GSSG再生成GSH。



CN 109652402 A

1.酶电极,其特征是按照如下步骤制备而得:

1)、利用DCM降解菌MethylobacteriumH13制备获得重组工程菌;将重组工程菌进行诱导培养表达和纯化,从而获得浓度为1.366±0.2g/L的DCM脱卤酶纯酶液;

2)制备酶电极:

先将导电材料依次进行抛光处理、洗净、晾干,得电极基体;

按照8～12ml/1g的液料比,将DCM脱卤酶纯酶液与海藻酸钠进行混合,得包埋料;

将包埋料涂抹于电极基体表面,并确保整个电极基体表面全部被包埋料所包裹;然后于室温下置于浓度为10±1g/L的$Ca(NO_3)_2$溶液中固定10±2min;再用超纯水进行水洗,得酶电极。

2.根据权利要求1所述的酶电极,其特征是:所述步骤2)中,将包埋料涂抹于电极基体表面,形成半球体;并确保整个电极基体表面全部被半球体包裹于内部。

3.根据权利要求1或2所述的酶电极,其特征是:从DCM降解菌MethylobacteriumH13的全基因组中克隆得到DCM脱卤酶基因,将其连接至pET28b(+)质粒,导入大肠杆菌E.coliBL21(DE3),从而得到重组工程菌。

4.根据权利要求3所述的酶电极,其特征是:所述导电材料为石墨或玻碳。

5.利用如权利要求1～4任一所述的酶电极进行的基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽再生方法,其特征是:

以酶电极作为阴极,铂电极作为阳极,使用阳离子交换膜将反应器分隔为阳极电解槽和阴极电解槽,在阴极电解槽注入含DCM废水、作为辅酶的还原型谷胱甘肽GSH,阴极电解槽内,GSH与含DCM废水的料液比为5～35mg/L;调节pH为7～8,调节水浴温度为25～45℃,用电源控制电路电流为5～45mA进行恒定电流电解2±0.5h。

6.根据权利要求5所述的基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽再生方法,其特征是:

调节pH为7.0,调节水浴温度为35℃,用电源控制电路电流15mA;电解时间为2h。

基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽再生方法及酶电极

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽再生方法及酶电极。

背景技术

[0002] 谷胱甘肽广泛存在于动植物和微生物中，是细胞内最丰富的小分子硫醇类化合物。还原型谷胱甘肽(GSH)是细胞内非蛋白硫氢基团的主要组成部分，由谷氨酸(Glu)、半肌氨酸(Cys)和甘氨酸(Gly)经肽键缩合而成的三肽，相对分子质量为307.32，等电点为5.93，常温下为白色晶体，易溶于水、低浓度乙醇水溶液、液氨和二甲基甲酰胺，在生物体内大量存在并起主要作用。

[0003] 目前已有的再生方法包括酶法、电化学法再生辅酶、光化学法等。酶法再生的优点在于反应速率快，选择性高，再生体系与合成体系兼容性好；但所用酶往往比较昂贵，且体系涉及两种或两种以上酶；另，酶的最适应用条件往往不一致，给过程优化带来困难。光化学法利用的是廉价且洁净的光能，通常需要光敏剂、电子媒介物和电子供体。光化学再生法目前还没有得到理想的效果，其再生效率很低，但具有广阔的潜在应用价值。电化学法的再生能量来自于洁净的电能，与酶法相比成本低。电化学法中氧化还原电势的控制和反应过程的监测都较为容易，具有操作简单、灵敏度高、仪器设备简单等优点。

[0004] 目前，现有的电化学辅酶再生法具体为：在负载有谷胱甘肽还原酶(GR)的电极上施加一个负电位，E＝-0.72V(相对于参比电极)，将氧化型谷胱甘肽GSSG还原成还原型谷胱甘肽GSH，其机理可以总结为以下公式：$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$；其中，NADPH起传递电子的作用，将电极上的电子转移到酶上，完成GSH的再生过程。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽(GSH)再生方法及所用酶电极，本发明的方法过程简单，再生成本较低。

[0006] 为了解决上述技术问题，本发明提供一种酶电极，按照如下步骤制备而得：

[0007] 1)、利用DCM降解菌MethylobacteriumH13(CCTCC No:M 2010121)制备获得重组工程菌；将重组工程菌进行诱导培养表达和纯化，从而获得浓度为1.366±0.2g/L的DCM脱卤酶纯酶液；

[0008] 2)制备酶电极(作为媒介)：

[0009] 先将导电材料依次进行抛光处理、洗净、晾干，得电极基体；

[0010] 按照8～12ml/1g的液料比，将DCM脱卤酶纯酶液与海藻酸钠进行混合，得包埋料；

[0011] 将包埋料涂抹于电极基体表面，并确保整个电极基体表面全部被包埋料所包裹；然后于室温下置于浓度为10±1g/L的$Ca(NO_3)_2$溶液中固定10±2min；再用超纯水进行水洗(从而洗去附着于酶电极表面的$Ca(NO_3)_2$溶液)，得酶电极(即，固载酶的电极)。

[0012] 作为本发明的酶电极的改进：所述步骤2)中，将包埋料涂抹于电极基体表面，形成半球体；并确保整个电极基体表面全部被半球体包裹于内部。

[0013] 当电极基体的直径为1.5cm时，半球体的半径约为2cm。

[0014] 作为本发明的酶电极的进一步改进：从DCM降解菌MethylobacteriumH13(CCTCC No:M 2010121)的全基因组中克隆得到DCM脱卤酶基因，将其连接至pET28b(+)质粒，导入大肠杆菌E.coli BL21(DE3)，从而得到重组工程菌。

[0015] 作为本发明的酶电极的进一步改进：所述导电材料为石墨或玻碳。

[0016] 本发明还同时提供了利用上述酶电极进行的基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽(GSH)再生方法(电化学辅酶再生方法)：以酶电极作为阴极，铂电极作为阳极，使用阳离子交换膜将反应器分隔为阳极电解槽(阳极室)和阴极电解槽(阴极室)，在阴极电解槽注入含DCM废水、作为辅酶的还原型谷胱甘肽GSH，阴极电解槽内，GSH与含DCM废水的料液比为5～35mg/L；调节pH为7～8，调节水浴温度为25～45℃，用电源控制电路电流为5～45mA进行恒定电流电解2±0.5h。

[0017] 作为本发明的基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽再生方法的改进：

[0018] 调节pH为7.0，调节水浴温度为35℃，用电源控制电路电流15mA；电解时间为2h。

[0019] 本发明体现了生物电化学脱氯过程中发生还原型谷胱甘肽再生；GSSG在阴极提供电子还原力的驱动下被再生为GSH。

[0020] 传统二氯甲烷(DCM)降解方法首先在还原型谷胱甘肽(GSH)和DCM脱卤酶的作用下，脱去一个Cl原子，形成S-氯甲基谷胱甘肽，然后通过自身水解反应再脱去一个Cl原子，进一步被水解为氧化型谷胱甘肽(GSSG)和甲醛；甲醛继续被氧化为CO_2和H_2O。

[0021] 微生物细胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)是氧化型谷胱甘肽(GSSG)再生为还原型谷胱甘肽(GSH)的氢供体。当细胞内缺乏足量电子供体时，$NADP^+$无法及时转化为NADPH，从而制约了还原型谷胱甘肽再生过程；本发明提出应用电化学技术来强化上述过程，通过电化学方法为辅酶再生提供充足的电子，促进氧化型谷胱甘肽(GSSG)再生成还原型谷胱甘肽(GSH)。本发明的优点在于GSSG在阴极提供电子还原力的驱动下被再生为GSH。利用电化学技术，以酶电极为媒介，为辅酶GSH再生提供充足的电子，促进GSSG再生成GSH。

附图说明

[0022] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0023] 图1是本发明的装置图；

[0024] 图2为本发明中DCM降解率随时间的变化关系图；

[0025] 图3为不同条件下的辅酶的再生图；

[0026] 图4为GSH再生的最适电流图；

[0027] 图5为GSH再生的最适pH图；

[0028] 图6为GSH再生的最适温度图；

[0029] 图7为DCM浓度对GSH再生的影响图；

[0030] 图8为不同酶固定方法DCM降解率随时间变化关系图。

具体实施方式

[0031] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述，但本发明的保护范围并不仅限于

此：

[0032] 实施例1、用于处理含DCM废水的酶电极的制备方法，依次以下步骤：

[0033] 1)、以石墨作为导电材料，将石墨依次用直径为1.0、0.3、0.05和0.01μm氧化铝粉在麂皮上抛光(打磨光滑即可)，然后置于超纯水中超声清洗5min，得到表面干净的石墨基体(直径约1.5cm)；取出自然晾干至表面无可见水分，得电极基体。

[0034] 2)、利用重组工程菌制备DCM脱卤酶纯酶液：

[0035] ①先利用DCM降解菌Methylobacterium H13(CCTCC No:M 2010121)制备获得重组工程菌，具体如下：

[0036] 从DCM降解菌Methylobacterium H13(CCTCC No:M 2010121)的全基因组中经PCR克隆得到DCM脱卤酶基因。为了克隆，上下游引物分别加上限制性酶切位点BamHI和Xho I，酶切位点前面分别加了保护碱基，具体如下：

[0037] Primer S1(5'-TCCGGATCCATGGTGAGCCCGAATCCAACGAAC-3')

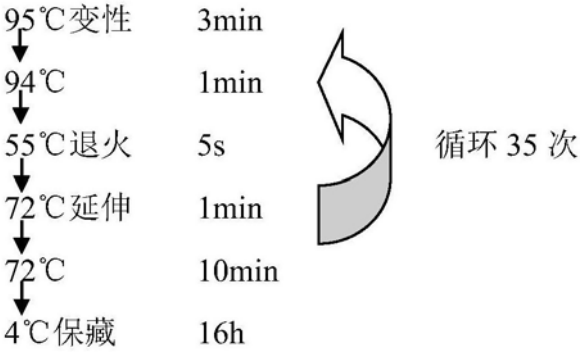
[0038] BamHI

[0039] Primer S2(5'-ATAATTCTCGAGAGCGACTGCCGCGCCCTC-3')

[0040] Xho I

[0041] 构建50μL的PCR扩增体系：4μLdNTP、5μL 10×buffer、1μL引物P2、1μL引物P5、1.75μLDNA、无菌去离子水补足至50μL。PCR反应条件设定为：

[0042]



[0043] PCR产物即为DCM脱卤酶基因，DCM脱卤酶基因的序列如序列表NO1所述。将其连接至pET28b(+)质粒，导入大肠杆菌E.coli BL21(DE3)，从而得到重组工程菌。

[0044] 连接反应体系如下：

[0045]

组分	20μL 体系	终浓度
线性载体 DNA	XμL	20-100ng
插入 DNA 片段	YμL	插入片段：载体=1~5：1（优选 3:1）
10×Ligation Buffer	2μL	1×
T4 DNA Ligase ， 5U/μl	0.2μL	1U
RVase-Free Water	补足 20μL	

[0046] 转化方法如下：

[0047] 在100mL融化状态的LB培养基中加入500μL(10mg/mL)Kan，还未凝固时混合均匀倒

入灭菌培养皿中。取出1管大肠杆菌E.coli BL21(DE3)感受态细胞，放置于冰里融化30min。向150μL感受态细胞中加入3μL质粒，将离心管放置于42℃水浴，热击90s，快速将离心管转移至冰浴，放置60s。每管加800μL LB培养基，在37℃摇床温育45min，使细菌复苏。取50μL转化好的菌体涂布于含有抗生素(kan)的LB平板，于37℃倒置培养过夜。

[0048] 用枪头随机挑取LB平板上的1个菌落，接种到50mL pH＝7的LB液体培养基(含50μg/ml卡那霉素)中，摇床培养条件为37℃、200rpm，培养至OD_{600}＝0.6。

[0049] ②制备DCM脱卤酶纯酶液：

[0050] 将重组工程菌经诱导培养再表达：取1mL重组工程菌液接种到50mL pH＝7的LB液体培养基(含50μg/ml卡那霉素)中，摇床培养条件为37℃、200rpm，培养至OD_{600}＝0.6。然后加入50μL IPTG诱导剂(50mg/mL)诱导产酶，20℃摇床培养12h，得OD_{600}＝2.2的菌液；

[0051] 菌液配平后在4℃、10000rpm、10min条件下离心，收集菌体。以1g菌体/5ml PBS缓冲液(pH＝7，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.03mol/L、KH_2PO_4 0.02mol/L)的比例加入适量的PBS缓冲液，吹打混匀后在相同离心条件下离心并收集菌体，该步骤重复两次。再以相同比例加入PBS缓冲液混匀后在冰水浴条件下超声破碎，设置参数：工作3s，停2s，次数99次，功率350W。破碎后的菌液在4℃、12000rpm、15min条件下离心，收集上清液，即粗酶液；

[0052] 将粗酶液利用Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒进行纯化(镍柱层析)，纯化工艺为：

[0053] a)关闭出液口，加入2～5mL Ni柱，静置10min，待分层后，打开出液口。

[0054] b)加入10mL超纯水洗去乙醇。

[0055] c)加入20mL Binding Buffer平衡柱子，结束后关闭出液口。

[0056] d)在粗酶液中加入Binding Buffer等倍稀释，将上述稀释后的粗酶液(约60mL)加入Ni柱，吹打混匀，静置分层后，打开出液口。

[0057] e)加入30mL倍体积Binding Buffer洗脱杂蛋白，结束后关闭出液口。

[0058] f)加入20mL Elution Buffer吹打混匀，静置分层后，打开出液口，收集流出液，得到20mL浓度为1.4g/L的DCM脱卤酶纯酶液。

[0059] g)依次加入20mL超纯水和10mL20％乙醇清洗柱子。最后加入2～5mL 20％乙醇回收Ni柱。

[0060] 3)、将20mL DCM脱卤酶纯酶液与2g海藻酸钠混合后，于室温下用玻璃棒搅拌3～5min至两者充分混匀，得包埋料；

[0061] 将上述包埋料涂抹于步骤1)所得的电极基体表面，得到半径为2cm的半球体，并确保整个电极基体表面全部被半球体包裹于内部；然后于室温下置于浓度为10g/L的$Ca(NO_3)_2$溶液中固定10min；再用超纯水进行水洗(从而洗去附着于酶电极表面的$Ca(NO_3)_2$溶液)，得酶电极(即，固载酶的电极)。

[0062] 实施例2、一种用于处理DCM的酶电耦合脱氯系统装置，如图1所示，由控温系统、电解反应器和pH调节系统三部分组成。

[0063] 电解反应器包括电源1和反应槽15，电源1为电-生物酶系统提供电流，同时通过电流表2实时监测电流。反应槽15置于恒温磁力搅拌器8之上，在反应槽15内设有阴离子交换膜7，从而将反应槽15分隔形成阴极电解槽和阳极电解槽，在阴极电解槽内设有与恒温磁力搅拌器8相连的磁力转子10，在恒温磁力搅拌器8的带动下，磁力转子10对反应槽15内液体

进行均匀搅拌;在阴极电解槽内设置作为阴极的酶电极9(实施例1制备而得,以DCM脱卤酶修饰的石墨电极),在阳极电解槽内设置作为阳极的铂电极3;酶电极9与铂电极3均与电源1电连接;铂电极3与电源1之间设有电流表2。

[0064] 阴极电解槽的内部结构为:设有采样口11、酸液进入口13、pH检测仪插入口16、酶电极9、磁力转子10;

[0065] 控温系统包括恒温水浴锅6,反应槽分别通过进水管4、出水管5与恒温水浴锅6相连通;从而控制反应槽15内液体的温度;

[0066] pH调节系统包括pH检测仪12和硫酸溶液容器14,pH检测仪12与阴极电解槽上的pH检测仪插入口16相连通;硫酸溶液容器14与酶电极9内的酸液进入口13相连通;利用该pH调节系统控制反应槽15内液体的pH值。

[0067] 实施例3、利用如实施例2所述的系统装置,在阳极电解槽内注入100mL的0.01M磷酸盐缓冲液,在阴极电解槽注入200mL的0.01M磷酸盐缓冲液、以及加入3mg的作为辅酶的还原型谷胱甘肽(GSH)、1.5μLDCM,调节pH为7(利用浓度为20%的稀硫酸溶液进行调节),调节水浴温度为35℃,用电源控制电路电流为15mA进行恒定电流电解2h。

[0068] 此时,DCM脱氯酶的用量为28mg;阴极电解槽内,GSH与含DCM废水料液比为3mg/200mL=15mg/L。

[0069] 如图2所示,对阴极电解槽内的液体进行检测,不同时间下的DCM浓度和降解率如下表1:

[0070] 表1

[0071]

降解时间(min)	DCM浓度(体积%)	降解率(%)
0	7.5×10^{-4}%	0
30	3.75×10^{-4}%	50
60	2.02×10^{-4}%	73
90	1.12×10^{-4}%	85
120	7.5×10^{-5}%	90

[0072] 实施例4、辅酶再生测定

[0073] 谷胱甘肽广泛存在于各种动植物中,它在生物体内以GSH和GSSG两种形态存在。GSH是DCM生物降解的辅酶,在该反应中,GSH被氧化为GSSG,GSSG可以在细胞内经过一系列还原反应再生为GSH。电-生物酶耦合降解DCM则是利用表达纯化的DCM脱氯酶,故需要额外添加辅酶GSH。为维持反应的进行,需不断提供GSH或将产物GSSG再生为GSH。在电-生物酶强化DCM脱氯过程中,考察了GSSG再生为GSH的条件,详见表2。

[0074] 表2、辅酶再生设计条件

[0075]

Group	T-GSH（mg）	GSH（mg）	GSSG（mg）	电流（mA）	生物酶（mg）
1(GSH)	0	50	0	0	0
2(GSH+I)	0	50	0	15	0
3(GSSG)	0	0	25	0	0
4(GSSG+I)	0	0	25	15	0
5(E+GSH)	0	50	0	0	28
6(E+GSH+I)	0	50	0	15	28
7(E+GSSG)	0	0	25	0	28
8(E+GSSG+I)	0	0	25	15	28

[0076] 采用试剂盒对液体样本中GSH进行测定，它是利用DTNB的循环反应来分别测定总谷胱甘肽(T-GSH)和GSSG的含量，然后利用公式计算GSH的含量。为了验证辅酶在电-生物酶脱氯中能否再生，分别对GSH和GSSG进行添加实验。group 1和group 3分别表示GSH和GSSG在不进行DCM脱氯下2h后的总量。如图3，group 1和group 3体系中内的T-GSH相比于总投加量均有下降，分别为44.71mg和47mg，且group 1体系里出现了GSSG，其含量为4.84mg，说明，随着放置时间延长，部分GSH会被氧化为GSSG。group 2和group 4则是在group 1和group 3的基础上增加15mA的电流，结果表明group 2体系内GSSG的含量很低，仅占group 1中GSSG含量的12％，与此同时group 4体系相比于group 3，检测出了GSH，其含量为14.89mg，说明电流作用下，GSSG会转化为GSH。group 8是以GSSG为辅酶进行电-生物酶脱氯实验，在该体系内GSSG和GSH的含量分别为19.26mg和3.48mg，其相比于直接添加GSH的group 6，GSSG的含量增加了7.14mg，GSH的含量少17.74mg。总上可知，电流能提供电子，促使GSSG还原为GSH，故GSH和GSSG均能作为辅酶进行电-生物酶对DCM脱氯。

[0077] 另外，还分别考察了GSH和GSSG在生物酶脱氯体系内的含量变化，发现以GSH为辅酶进行生物酶脱氯，反应2h后，大部分的GSH转化为GSSG，而以GSSG为辅酶的生物酶脱氯体系中未检测到GSH，主要原因可能是生物酶脱氯体系内缺少GSSG再生为GSH的氢供体。以上分析证明，GSH在DCM酶降解DCM中起着辅酶的作用。另外，电-生物酶耦合比单独生物酶脱氯效果好，可能的原因是随着DCM酶对DCM进行脱氯，GSH会转变成GSSG，从而减少辅酶的量，电化学可以提供充足的电子，从而有助于GSSG再生循环为GSH，增加DCM脱氯效率。

[0078] 实施例5:电流强度对GSH再生的作用

[0079] 将实施例3中的电流改为;5mA、15mA、25mA和35mA进行实验，设定电解液的pH值7，温度35℃，辅酶GSSG 3mg，DCM脱氯酶28mg。每隔30min从阴极电解槽里获取1mL的液体样本，采用0.22μm微孔滤膜进行过滤处理，用HPLC检测液体样本中GSH的含量，结果如图4所示。在同一时刻，GSH含量开始随着电流的增大而增大。电流为15mA时，GSH的再生效果最佳，其含量为3.98mg。当电流为35mA，GSH的再生效果急速下降，且GSH的含量仅占电流15mA时的6％

左右。

[0080] 实施例6:pH值对GSH再生的影响

[0081] 将实施例3中的pH改为:5、6、7、8、9,设定其他条件不变时测定GSH再生效果,结果如图5所示。在同一时刻,GSH的含量先随着pH的增大而增加,当pH大于8,GSH的含量随着pH的增大而减少,说明辅酶GSH再生的最佳pH为7,反应2h后,GSH的生成量为3.98mg。而pH为6时,体系中GSH含量仅为0.87mg,可知辅酶GSH的再生对酸度的耐受性很差。综上,在电流强化辅酶再生过程中,GSH的再生对体系pH的要求较高,其在中性条件下的再生效果最佳,弱碱性次之,酸性条件最差。

[0082] 实施例7:温度对GSH再生的影响

[0083] 将实施例3中的温度改为:25℃、30℃、35℃、40℃和45℃,设定其他条件不变时对辅酶再生的影响,结果如图6所示。

[0084] GSH的含量先随温度增加而增加,当温度高于35℃,GSH含量随着温度增加而下降。GSH再生的最适温度为35℃,反应2h后,其含量为5.09mg。高温不利于辅酶再生,温度为45℃所检测的GSH含量为1.89mg,仅占35℃时GSH含量的37.13%。综上,在电强化辅酶再生的过程中,最适温度为35℃。

[0085] 实施例8:DCM浓度对GSH再生的作用

[0086] 将实施例3中的DCM的量改为:0μL、0.75μL、1.5μL、2.25μL、3.0μL,即DCM的浓度分别为0mg/L、5mg/L、10mg/L、15mg/L、20mg/L,设定其他条件不变时考察DCM浓度为对辅酶对GSH再生的影响,结果见图7。当DCM浓度为0mg/L时,反应2h,该体系辅酶GSH的含量为5.09mg,其是DCM浓度为5mg/L时的2.2倍,可见,DCM对辅酶的再生有一定的抑制作用。另外,实验结果显示DCM浓度的高低对辅酶GSH再生的抑制作用差别不大。

[0087] 对比例1、

[0088] 将实施例1中的“重组工程菌”改成直接选用原始菌株M.rhodesianum H13(CCTCC No:M 2010121);将其培养至OD_{600}=2.2(同实施例1)的菌液;将此菌液经超声破碎、镍柱层析进行纯化;以此纯化所得物与实施例1所得纯酶液进行对比试验,具体试验如下:

[0089] 采用脱卤素酶-甲醛脱氢酶偶联反应NADH显色法检测酶活,结果如表3所示,重组工程菌的酶活是原始菌株M.rhodesianum H13的3倍,表明M.rhodesianum H13的DCM脱卤基因片段在E.coli BL21(DE3)的表达更为高效。由此可推断基于重组工程菌的耦合脱氯系统对DCM的降解效果要优于基于原始菌株M.rhodesianum H13的耦合脱氯系统

[0090] 表3原始菌株和重组工程菌的酶活对比

[0091]

菌株	活力(U/mg)
BL21 (DE3) with pET28b(+)-*dcm*	0.00686±0.00005
wild type *M. rhodesianum* H13	0.00264±0.00006

[0092] 对比例2、

[0093] 将实施例1中的酶电极制备方法改成按照200510130039.6所述的制备方法制备酶电极。以此酶电极替代实施例2中的酶电极，从而获得相应的酶电耦合脱氯系统装置。

[0094] 以此酶电耦合脱氯系统装置替代实施例3中的酶电耦合脱氯系统装置，其余等同于实施例3。

[0095] 所得结果为:降解30min，降解率为1.5％;降解120min，降解率为40％。

[0096] 其与本发明的对比如图8所示。

[0097] 最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然，本发明不限于以上实施例，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

序列表

<110> 浙江工业大学

<120> 基于电化学的辅酶还原型谷胱甘肽再生方法及酶电极

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 867

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

gtgagcccga atccaacgaa catacatacg ggtaagacct tgcgcctact ttatcatccg 60
gggtcccagc catgccgctc agcacatcaa ttcatgtatg agattgacgt tcccttcgag 120
gaagaagtcg tggacatctc cacggacatc accgagaggc aagagttcag ggataagtac 180
aacccgacgg ggcaggttcc gattctcgtt gatggtgagt tcaccgtttg ggagagcgta 240
gccatcgcgc gctacgtgaa cgagaagttc gacggcgccg gcaactggtt cggacgcggc 300
acgcaagaga gggcgcagat caaccagttt ctacaatggt acgcctatac tctccgcctt 360
ggaggtgggg cgttccactg gaacatcttc ggctgtttga tctatgggga gaagccgtac 420
agtccaaaat tcaccgcgga gcaaaacaaa gggcgcaccc ttttgtacga agccatgggg 480
acgctagaga attactggct gagggaccgc gaatatgttt gcggggatga ggtcagctat 540
gcggatttgg ccgctttcca tgagttcgtg tcgcatgagg ccggcaagat cattccggac 600
cgtgtctggc aaggattccc caaaatcgcg gcatggttca agaaactatc tgaacggcct 660
cacgcgaaga ccgtgagcga gtggcagtat acgaacgtcg ggaaaataat ccgaggcgag 720
ttaacggcga gtatgtttaa gcgcaagacg gctgtgttga aggggacgga ggtcttcagc 780
ggacacaacc atggaattcc ttacttgaac gagaaggcag aggactactt caagcgggtt 840
gagaaggagg gcgcggcagt cgcttag 867

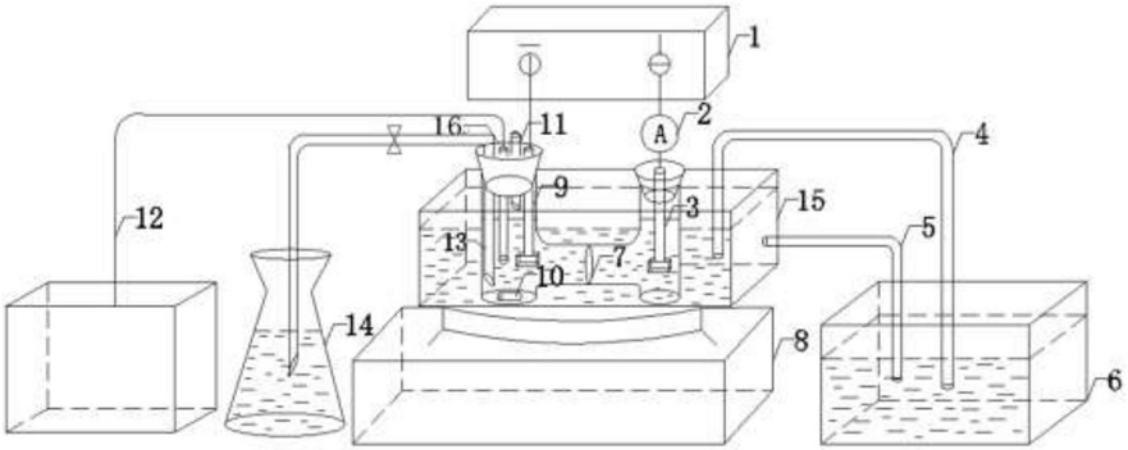

1
2
A
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

图1

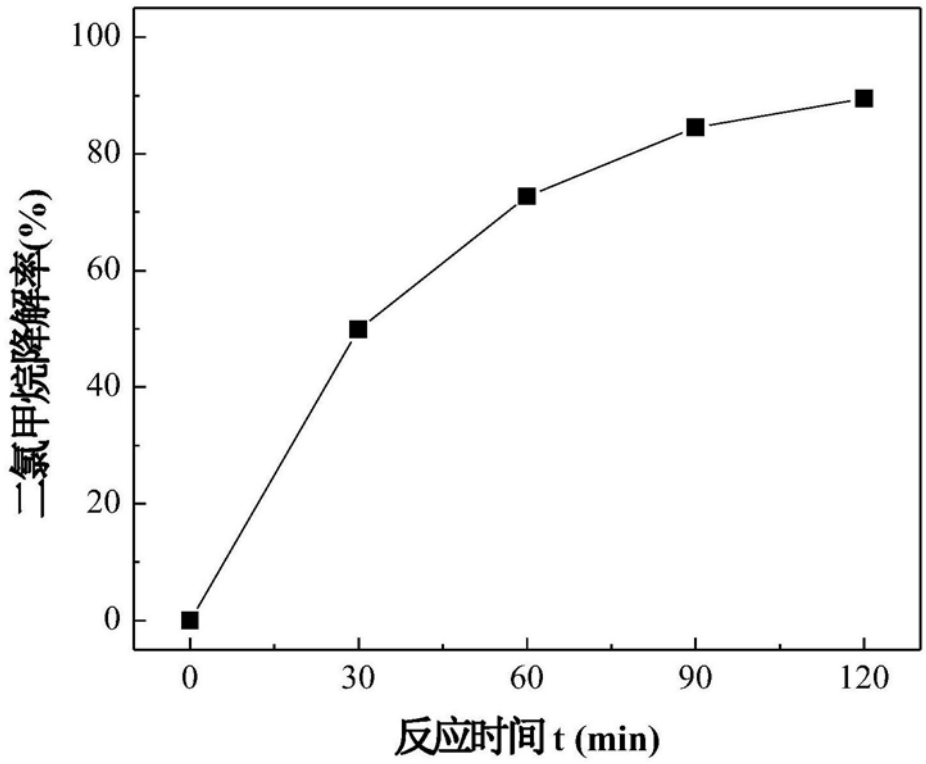

二氯甲烷降解率(%)
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
反应时间 t (min)

图2

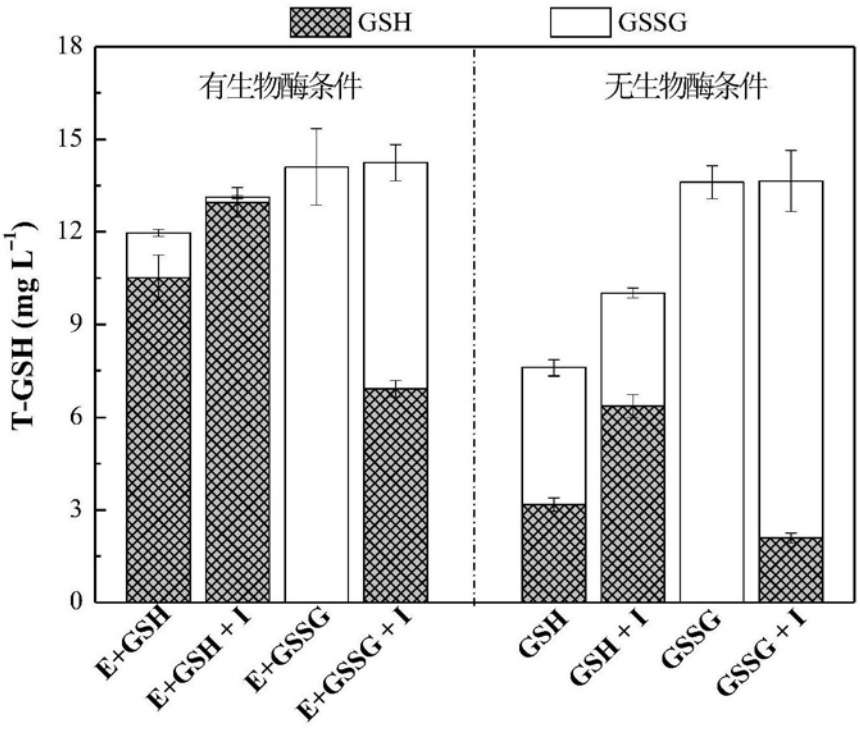

GSH
GSSG
有生物酶条件
无生物酶条件
T-GSH (mg L-1)
18
15
12
9
6
3
0
E+GSH
E+GSH + I
E+GSSG
E+GSSG + I
GSH
GSH + I
GSSG
GSSG + I

图3

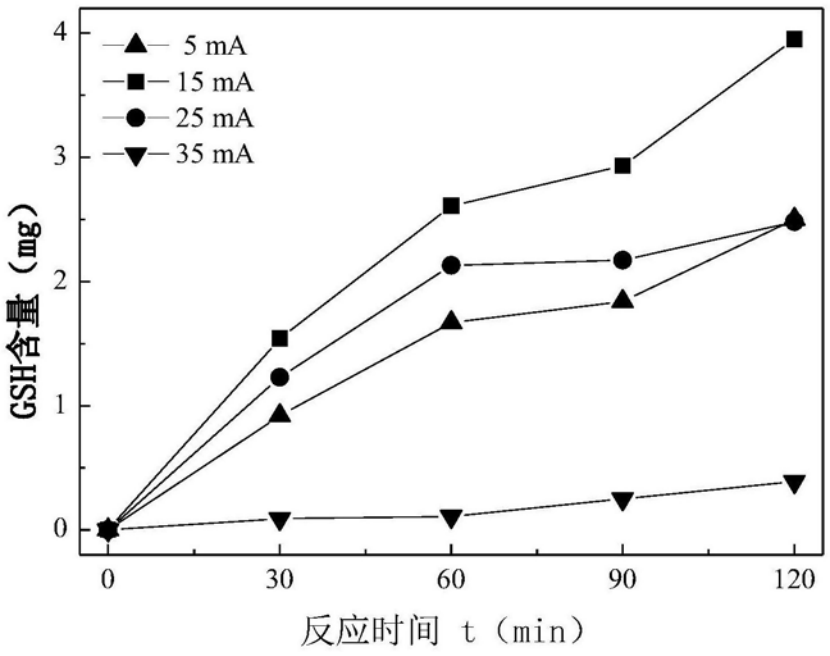

5 mA
15 mA
25 mA
35 mA
GSH含量（mg）
4
3
2
1
0
0
30
60
90
120
反应时间 t（min）

图4

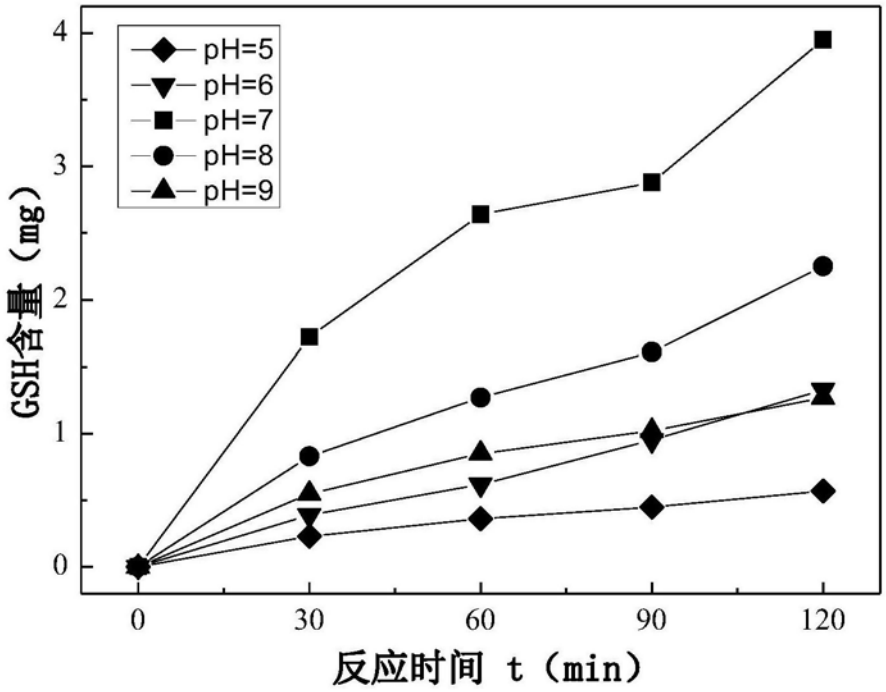

pH=5
pH=6
pH=7
pH=8
pH=9
GSH含量（mg）
反应时间 t（min）
0
1
2
3
4
0
30
60
90
120

图5

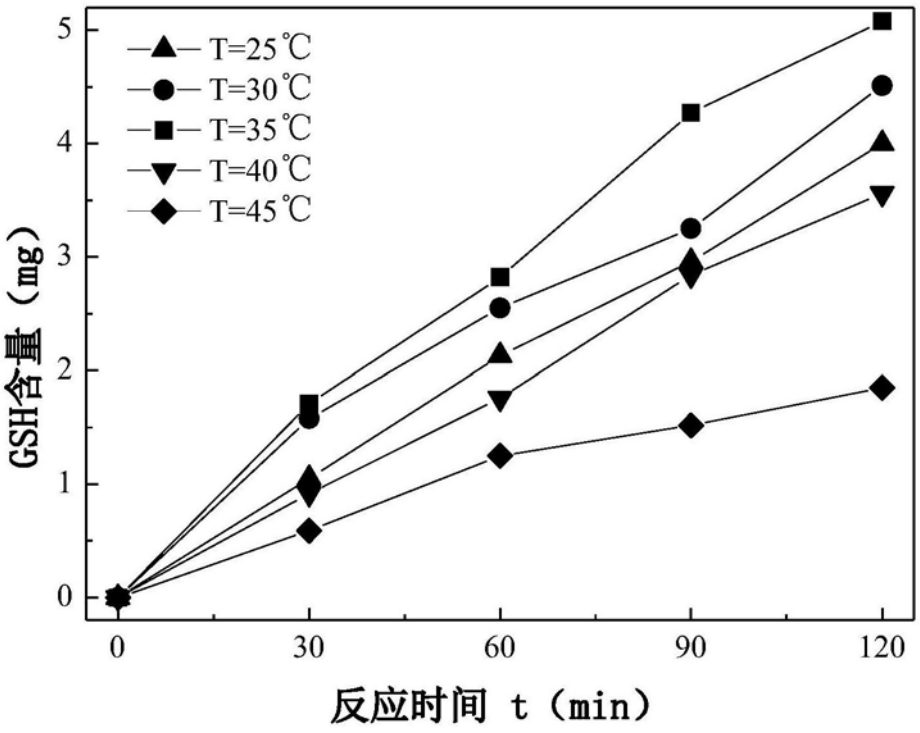

T=25℃
T=30℃
T=35℃
T=40℃
T=45℃
GSH含量（mg）
反应时间 t（min）
0
1
2
3
4
5
0
30
60
90
120

图6

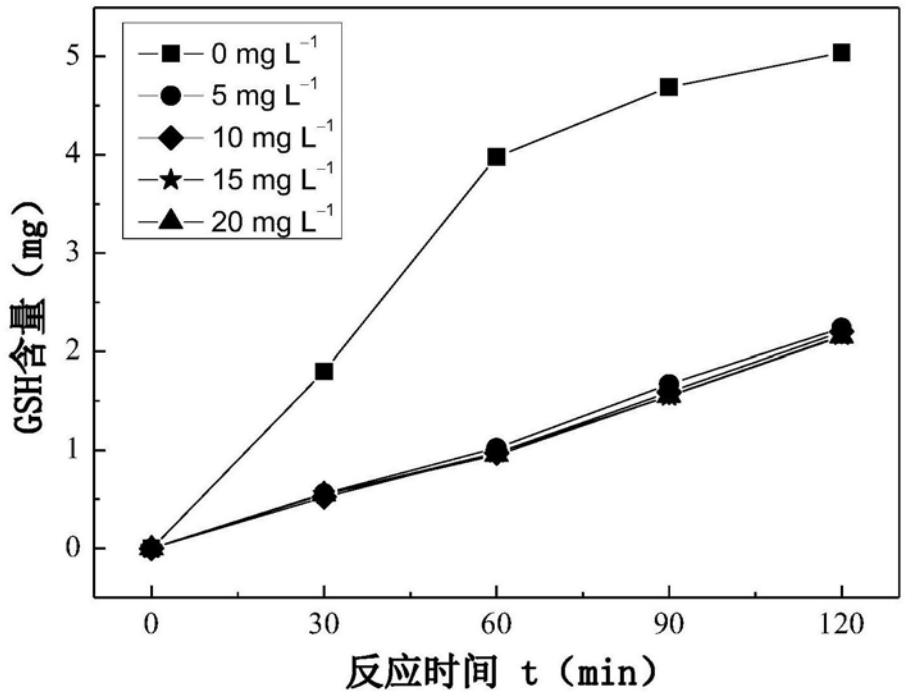

0 mg L-1
5 mg L-1
10 mg L-1
15 mg L-1
20 mg L-1
GSH含量（mg）
反应时间 t（min）
0
1
2
3
4
5
0
30
60
90
120

图7

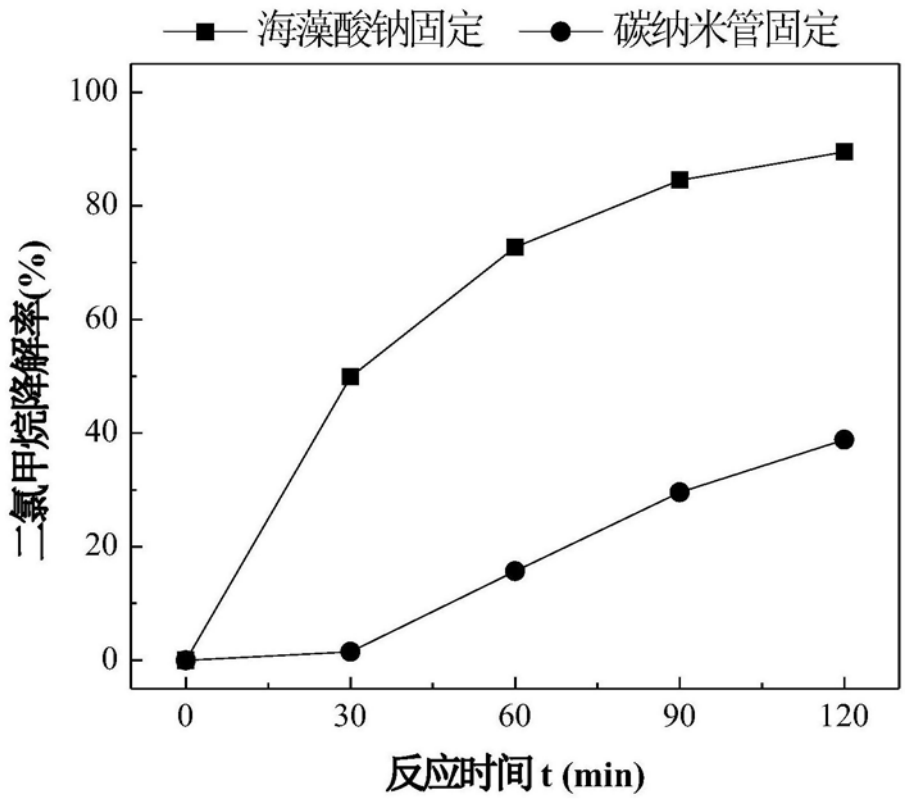

海藻酸钠固定
碳纳米管固定
二氯甲烷降解率(%)
反应时间 t (min)
0
20
40
60
80
100
0
30
60
90
120

图8