氧化还原酶催化机理研究的沿革和新探

庄小燕¹, 张琰琨¹, 方柏山^{1,2,3*}

1. 厦门大学化学化工学院, 化学工程与生物工程系, 厦门 361005;

2. 厦门大学厦门市合成生物学重点实验室, 厦门 361005;

3. 厦门大学福建省化学生物学重点实验室, 厦门 361005

* 联系人, E-mail: fbs@xmu.edu.cn

2020-10-14 收稿, 2020-11-18 修回, 2020-12-18 接受, 2021-01-05 网络版发表

国家自然科学基金(21978245)和博士后创新人才支持计划(BX20200197)资助

摘要 氧化还原酶在生命代谢中起着至关重要的作用. 自1951年经典氧化还原酶催化机制的提出, 对该机制的研究和修饰一直是热点. 本文首先系统地介绍氧化还原酶催化机理研究的沿革, 提出两个值得探讨的科学问题: (1) 细胞内与氧化还原酶结合的辅酶经历氧化或还原后是否非得解离? (2) 细胞内NAD(P)H依赖型氧化还原酶与其相应的辅酶是否存在自组装? 基于本课题组前期关于NAD(P)H依赖型氧化还原酶催化实验中的新发现, 近期以NADH依赖型甲酸脱氢酶为研究对象, 应用扫描隧道显微镜断裂连接系统考察单分子酶结合辅酶、催化底物过程的实时导电性, 介绍我们对氧化还原酶催化机理的新探索, 即氧化还原酶催化反应后辅酶是否会从反应空腔脱离. 基于该机理的讨论和新探索, 既是基于传统机理的进一步研究, 同时有望更新传统的全细胞发酵、多酶耦联催化、酶活性检测、生物传感器等技术.

关键词 氧化还原酶, 催化机理, 单分子酶, 辅酶

众所周知, NAD(P)H依赖型氧化还原酶能够通过转移氢(H^-)基团到烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+ 或 $NADP^+$)辅因子氧化底物, 还原形成NADH或NADPH. 2020年已经有超过15万个不同的序列被注释或预测为NAD(P)H依赖型氧化还原酶^[1]. 在BRENDA最新注册(表1)上的氧化还原酶约占所有酶的26%(新增加移位酶), 其中使用NADH/ NAD^+ 和/或NADPH/ $NADP^+$ 作为辅因子的氧化还原酶约占62%. NAD(P)H依赖型氧化还原酶催化众多反应, 同时在许多中心代谢途径中发挥关键作用. 由于其催化氧化还原反应的活性高、区域专一性和立体专一性强, 作为关键组分广泛应用于底物利用、化学合成、生物降解和解毒等场合^[2].

1 氧化还原酶催化机理研究的沿革

经典的NAD(P)H依赖型氧化还原酶催化机理是

Theorell-Chance机理^[3]. 于1951年由瑞典医学诺贝尔研究所的Theorell教授(1955年诺贝尔奖获得者)和宾夕法尼亚大学Chance教授共同提出^[3]. 该机理由3步化学反应组成: (1) 醇脱氢酶(ADH)与辅酶(NADH)结合形成还原态二元复合物(ADH-NADH); (2) 醛(Ald)在ADH-NADH上加氢形成醇(Alc), 并从氧化态二元复合物(ADH-NAD⁺)中解离; (3) 二元复合物(ADH-NAD⁺)中的氧化态辅酶(NAD^+)解离, 其逆过程则为还原反应:

此后, 采用不同方法研究马肝醇脱氢酶LADH和/或酵母醇脱氢酶(yeast alcohol dehydrogenase, YADH)

引用格式: 庄小燕, 张琰琨, 方柏山. 氧化还原酶催化机理研究的沿革和新探. 科学通报, 2021, 66: 1233–1239

Zhuang X Y, Zhang A H, Fang B S. The evolution and new exploration of the catalytic mechanism of oxidoreductase (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 1233–1239, doi: 10.1360/TB-2020-1304

表 1 在 BRENDA 注册的酶分布^{a)}

Table 1 The information of enzymes registered with BRENDA

氧化还原酶				转移酶	水解酶	裂解酶	异构酶	连接酶	移位酶
9574									
NAD(P) ⁺ 依赖型	NADPH 依赖型	NADH 依赖型	其他	6645	11217	5132	2096	1554	1092
2564	1961	1427	3622						

a) 截至 2020 年 10 月

催化各类底物或者辅酶 NAD(P)⁺/NAD(P)H 的反应动力学和机理. 较为突出的是 Theorell 教授的助手、牛津大学 Dalziel^[4] 基于 Theorell-Chance 机理于 1958 年提出了双底物(S₁和 S₂或 S₁'和 S₂')顺序随机酶(E)促反应机理, 并应用于伯醇、仲醇和醛等的肝醇脱氢酶催化研究, 该酶促反应机理如图 1 所示^[5].

20 世纪 70 年代以来, 高分辨 X 射线晶体衍射法也被用来研究醇脱氢酶与辅酶的成键行为和所形成的二元复合物与三元复合物. 如 2010 年 Plapp^[6] 利用 X 射线晶体研究了肝醇脱氢酶 E 结合 NAD⁺/NADH 之后构象的变化情况. 通过对晶体结构的分析, 得到类似的催化机理, 如图 2 所示. 该机理除了考虑三元复合物(E-NADH-RCHO 和 E-NAD⁺-RCH₂OH)外, 还提出二元复合物(E-NAD⁺)的过渡态(E*-NAD⁺). 2019 年, Kim 和 Plapp^[7] 基于此机理定量分析了肝醇脱氢酶和酵母醇脱氢酶催化过程三元复合物、某些氨基酸残基对催化的贡献.

20 世纪 80~90 年代, 拉曼光谱法^[8]与红外光谱法^[9]被用于研究辅酶分子的原位性质及其与酶活性位点、位点周边氨基酸残基的相互作用. 2000 年以来, 基因工程方法^[10]被用来研究酶催化的成键位点以及位点变异对酶活性以及酶与底物亲和力的影响. 当今, 模拟计算工具, 如蛋白质对接模拟(Docking)工具的应用^[11,12], 可提供酶活性与辅酶衍生物结构关系的分子机理信息.

有关 NAD(P)H 依赖型氧化还原酶催化效果表征的方法源于 1948 年的报道^[13]. 在加有一定体积由底物、辅酶和缓冲溶液组成的反应液的比色皿中, 在恒定温度下迅速加入适量待测酶液启动反应, 用紫外分光光度计在 340 nm 波长下测定吸光度的变化曲线, 用初速度法计算酶的活力.

综上所述, 从 1951 年以来的近 70 年中, 所有关于 NAD(P)H 依赖型氧化还原酶催化的研究仍然基于 Theorell-Chance 机理或其拓展机理: Dalziel 的双底物顺序随机酶促反应机理^[14]. 其本质是游离的 NAD(P)⁺或 NAD(P)H 与氧化还原酶结合, 形成二元复合物或与其

图 1 双底物顺序随机酶促反应机理^[5]Figure 1 Double substrate random enzymatic reaction mechanism^[5] 图 2 乙醇脱氢酶催化机理^[6]Figure 2 The catalysis mechanism of alcohol dehydrogenase^[6]

他底物形成三元或多元复合物, 经过氧化或还原反应直接或转化为过渡态后解离出 NAD(P)H 或 NAD(P)⁺. 研究的重点集中于应用各种新技术探索二元复合物如何形成或与其他底物形成三元或多元复合物后经过氧化或还原反应后如何直接进入或转化为过渡态.

然而, 对于支撑细胞生存涉及胞内成百上千的氧化还原酶而言, 催化过程中辅酶的传递、结合和解离速率都是影响酶催化反应的关键因素. 因此, 本文提出两个值得探讨的科学问题: (1) 细胞内与氧化还原酶结合的辅酶经历氧化或还原后是否非得解离? (2) 细胞内 NAD(P)H 依赖型氧化还原酶与其相应的辅酶是否存在自组装?

2 氧化还原酶催化机理的新探

2.1 细胞内与氧化还原酶结合的辅酶经历氧化或还原后是否非得解离?

为了解答该问题, 在检测氧化还原酶活性时, 我们

尝试用含有待测氧化还原酶的细胞(不经过细胞破壁分离提取酶)直接替代游离的酶,按照上述的常规方法考察吸光度变化。我们惊奇地发现,无论是肺炎克雷伯氏菌或克隆有相应酶基因的重组大肠杆菌,测定其胞内的1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR)和甘油脱氢酶(GDH)的酶活性,都与经过溶菌酶(lysozyme)破壁测得的酶的活性相当。结果如表2所示^[15,16]。

众所周知, NAD(P)H 依赖型氧化还原酶是胞内酶,大分子 NAD(P)H 不能穿透细胞膜分泌到胞外或渗透到胞内^[17]。由表2可知,除了系统误差外,当胞外的甘油或1,3-丙二醇与辅酶 NAD⁺同时存在时没有添加相应的酶也能检测到 NADH(见表2第5行的18.1和39.7;第9行28.4和第14行的22.9)。这意味胞外的甘油或1,3-丙二醇进入胞内在结合有辅酶 NAD⁺的甘油脱氢酶或1,3-丙二醇氧化还原酶催化下脱离的(H⁺)可能借助某种载体间接地转移到胞外与NAD⁺结合形成了NADH。据此,我们大胆假设:胞内氧化还原酶结合中心的NAD⁺转化成NADH后,解离的不是如 Theorell-Chance 机理等所述的 NADH,而是其中的氢负离子(H⁻)。

为了检验上述假设,以“甘油脱氢酶和辅酶 I 的共固定化”为例进行研究^[18]。先将辅酶 NAD⁺固定在水溶性载体上,装入层析柱中,依次流加甘油脱氢酶 GDH、底物甘油和结合缓冲洗脱液,测量流出液中的 GDH 蛋白浓度、产物浓度变化。研究发现,反应过

程中虽然所生成的二羟基丙酮脱离 GDH 酶蛋白的催化中心,但是辅酶没有与 GDH 酶蛋白脱离。这从一个侧面验证了我们假设的机理。

然而,上述所考察是否为特例? 存在哪些影响因素? 而且,所考察的毕竟是群体行为,要探究行为的本质,最好从单分子入手。近几年随着各种单分子检测技术的开发,为生命研究带来了新的机遇,2016年, Rief 课题组^[19]利用单分子光镊技术研究腺苷酸激酶的竞争性底物结合机制,揭示了酶如何快速进行底物的交换。2017年, Perkins 课题组^[20]自主开发了一种原子力显微镜(AFM)针头用于捕获单个细菌视紫红质蛋白,研究在不同拉伸力下蛋白结构发生的微小变化。2020年, Galenkamp 等人^[21]借助单分子纳米孔技术深入研究了二氢叶酸还原酶催化过程构型变化,通过电导变化捕获到反应过程存在的4种状态并测试了底物与酶的亲和力变化。

2003 年 *Science*^[22]、2006 年 *Nature*^[23] 分别报道了扫描隧道显微镜断裂连接(STM-BJ)技术用于表征和操纵单个分子电导特性的方法^[24]。该技术的复杂性为化学家提供了与物理学家和工程师合作的机会,将公认的化学原理导入分子线(molecular wires)中结构-电导率关系的研究中^[24]。该技术基于扫描隧道显微镜的原理,即通过针尖与基底之间的隧穿电流,扫描出样品表面的形态,进一步增加了断裂连接的环节,通过压电陶瓷精准的控制针尖与基底的距离和接触,有关该装置的

表 2 直接用不破壁克氏肺炎杆菌、重组大肠杆菌检测其PDOR和GDH的酶活性^{a)}

Table 2 The enzyme activity of PDOR and GDH from *pneumococcus pneumoniae* and recombinant *Escherichia coli*

	NAD ⁺	1,3-PD	PDOR(U/mL)	NAD ⁺	Glycerol	GDH(U/mL)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-0.53	-	+	-1.53
	+	-	4.44	+	-	1.29
	-	-	-0.56	-	-	-0.93
	+	+	18.1	+	+	39.7
Lysozyme	+	+	22.3	+	+	35.5
pET-dhaT/BL21(DE3)	-	+	0			
	+	-	0			
	+	+	28.4			
Lysozyme	+	+	24.6			
BL21(DE3)	+	+	0			
pET-gldA-74/BL21(DE3)				-	+	0
				+	-	0
				+	+	22.9
				+	+	0
BL21(DE3)						

a) “-”指在测试体系中未添加该试剂; “+”指在测试体系中添加了该试剂

设计和工程概念可参见文献[25].

近年来, STM-BJ技术在生物学领域得以应用. 2014年, Tao课题组[26]利用STM-BJ检测不同构型的DNA分子, 揭示了DNA分子的电荷输运方式. 2017年, Ruiz等人[27]首次检测含金属离子铜的单个天青蛋白的导电性, 提出电荷在该蛋白分子中以跃迁(hopping)的方式传导. 基于DNA分子的检测, 2018年, Brisendine等人[28]首次以氨基和羧基为锚定基团用STM-BJ检测多肽的导电性, 发现不同氨基酸组成的多肽电子传输能力不同. 可见, 将最先进的STM-BJ技术应用于NAD(P)H依赖型氧化还原酶导电性与可能存在的催化新机理的研究具有重大的科学意义和广阔的应用前景.

2.2 细胞内NAD(P)H依赖型氧化还原酶与其相应的辅酶是否存在自组装?

为了回答该问题, 我们基于电化学及傅里叶变换红外光谱法研究了酵母醇脱氢酶(YADH)与辅酶 I (NAD^+/NADH)的结合情况. 研究发现[29], 利用光谱法分别得到的水溶液和重水溶液中酵母醇脱氢酶与

NAD^+ 、 NADH 结合红外谱图显示 NAD^+ 和 NADH 中的腺嘌呤基团都会与醇脱氢酶活性中心的氨基酸残基氢键自组装, NAD^+ 的烟酰胺基团也会与醇脱氢酶的氨基酸残基形成氢键. 这也表明 NAD^+ 与酵母醇脱氢酶的结合属于自发的组装.

近年来, 本课题组[30]尝试性利用STM-BJ装置, 考察甲酸脱氢酶(FDH)的单分子导电性, 成功地检测到甲酸脱氢酶(FDH)单分子电导. 进一步研究其与 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 的组装过程实时电导变化, 发现与单独的FDH相比(图3), 添加 NAD^+ 后, FDH-NAD^+ 的电导增加了21倍, 而添加 NADP^+ 并没有引起电导的明显变化; 密度泛函理论计算表明FDH与 NAD^+ 结合使得原先从酶自身键内传输的电子通过与酶氢键结合的 NAD^+ 的捷径实现转移. 这从单分子尺度验证了 NAD^+ 与甲酸脱氢酶的自发组装. 同时考察了不同pH下甲酸脱氢酶的催化活性和电导值之间的关系, 发现酶催化活性与酶的电子传输能力之间存在一种正相关关系, 这有助于我们后续利用该技术进一步研究酶的催化机制.

图3 STM-BJ测试甲酸脱氢酶和辅酶示意图. (a) STM-BJ原理图及酶分子结合在金尖和基底的示意图; (b) NAD^+ 和 NADP^+ 结构示意图; (c), (d) 甲酸脱氢酶、甲酸脱氢酶+ NAD^+ 和甲酸脱氢酶+ NADP^+ 的1D电导图和单条曲线; (e) 随 NAD^+/FDH 浓度变化酶活和电导的变化; (f) pH对 FDH-NAD^+ 复合物的电导和酶活性的影响

Figure 3 The test schematic of FDH and cofactor by STM-BJ. (a) Schematic of STM-BJ and the enzyme junctions between tip and substrate; (b) the structure schematic of NAD^+ and NADP^+ ; (c), (d) the typical individual traces and one-dimensional (1D) conductance histograms for single-molecule conductance measurement of pure solvent, FDH, FDH-NAD^+ , and FDH-NADP^+ ; (e) plot of conductance in different proportion of FDH and NAD^+ ; (f) plot of FDH-NAD^+ conductance and specific activity in the buffers with different pH

1998年, 谢晓亮课题组^[31]报道的单分子水平胆固醇氧化酶催化动力学, 其胆固醇氧化酶活性中心就是直接包含一个黄素腺嘌呤二核苷酸辅酶(flavin adenine dinucleotide, FAD), *E*-FAD. 其氧化形式带有自发荧光, 而其还原形式没有荧光. 采用琼脂糖凝胶包裹酶分子, 在固定酶的同时又保持了酶的活性. 在胆固醇氧化酶催化底物生成产物的过程中, 该活性中心的FAD基团被还原成还原型黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH_2), 而后被氧气重新氧化生成FAD进行新一轮的反应(图4(a)). 他们采用荧光显微镜对单个酶催化生成单个产物时酶荧光强度的实时变化进行观测, 结果显示荧光强度随时间呈现频繁的开关(on-off)波动, 其中每一对 on-off 代表了一个完整的催化循环. 它意味着不管是氧化型或还原型辅酶, 它始终与胆固醇氧化酶活性中心组装在一起, 迁移的只是 H^+ 离子.

借此并综合对上述两个科学问题的初步探讨, 如果辅酶能与酶自发的组装, 并且反应结束不脱离的假设成立, 我们则提出如图4(b)所示的NAD(P)H依赖型氧化还原酶催化新机理. 与传统机理相比, 它减少了辅酶脱离(反应结束)和结合(反应开始)的步骤. 目前, 我们正基于前期建立的单分子测试平台, 跟踪监测单分子氧化还原酶催化反应过程中的状态变化. 希望其为揭示单分子氧化还原酶催化机制提供直接的证据.

3 结语

截至目前, 科研人员依旧研究群体水平下的酶催

图4 依赖黄素腺嘌呤二核苷酸辅酶的胆固醇氧化酶催化机理(a)以及NAD(P)H依赖型氧化还原酶催化新机理(b)

Figure 4 The catalysis mechanism of cholesterol oxidase which dependent on flavin adenine dinucleotide coenzyme (a) and the new catalysis mechanism of oxidoreductase which dependent on NAD(P)H (b)

化反应, 因此测得酶催化活性数值是整个酶群体某一时刻催化性能的平均值. 然而, 群体中的每个单分子酶不同步催化, 各阶段持续时间不同, 因此真正的单分子酶催化过程必定淹没在浩如瀚海、千姿百态的群体行为中. 氧化还原酶催化反应速率通常是极其迅速的(ms级别), 通过扫描隧道显微镜断裂连接技术等先进的仪器, 才能捕捉到其动态变化的瞬间. 因此单分子NAD(P)H依赖型氧化还原酶及其与辅酶结合和催化底物反应的研究, 可望革新沿袭近70年的传统机理. 以此建立的单分子酶电子学, 既可望广泛用于分析生命活动中酶催化的科学问题, 又可望更新传统的全细胞发酵、多酶耦联催化、酶活性检测、生物传感器开发等技术. 这不仅具有重大的科学意义而且具有广阔的应用前景.

致谢 感谢厦门大学洪文晶教授提供扫描隧道显微镜断裂连接(STM-BJ)装置和技术指导. 感谢华侨大学硕士生夏启容、李梓君和厦门大学硕士生钟和平、周小芬的前期探索.

参考文献

- 1 Stewart J D. Future directions in alcohol dehydrogenase-catalyzed reactions. In: Matsuda T, ed. Future Directions in Biocatalysis. Amsterdam: Elsevier, 2017. 85–95
- 2 Vidal L S, Kelly C L, Mordaka P M, et al. Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochem Biophys Acta*, 2018, 1866: 327–347
- 3 Theorell H, Bonnichsen R, Holtermann H, et al. Studies on liver alcohol dehydrogenase. I. Equilibria and initial reaction velocities. *Acta Chem Scand*, 1951, 5: 1105–1126
- 4 Dalziel K. The determination of constants in a general coenzyme reaction mechanism by initial rate measurements in the steady state. *Trans Faraday Soc*, 1958, 54: 1247–1253
- 5 Dalziel K, Dickinson F M. The kinetics and mechanism of liver alcohol dehydrogenase with primary and secondary alcohols as substrates. *Biochem J*, 1966, 100: 34–46
- 6 Plapp B V. Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 493: 3–12
- 7 Kim K, Plapp B V. Substitution of cysteine-153 ligated to the catalytic zinc in yeast alcohol dehydrogenase with aspartic acid and analysis of

- mechanisms of related medium chain dehydrogenases. *Chem-Biol Interact*, 2019, 302: 172–182
- 8 Deng H, Zheng J, Sloan D, et al. Classical Raman spectroscopic studies of NADH and NAD⁺ bound to lactate dehydrogenase by difference techniques. *Biochemistry*, 1989, 28: 1525–1533
  - 9 Nadolny C, Zundel G. Fourier transform infrared spectroscopic studies of proton transfer processes and the dissociation of Zn²⁺-bound water in alcohol dehydrogenases. *Eur J Biochem*, 1997, 247: 914–919
  - 10 Akal A L, Karan R, Hohl A, et al. A polyextremophilic alcohol dehydrogenase from the Atlantis^{II} Deep Red Sea brine pool. *FEBS Open Bio*, 2019, 9: 194–205
  - 11 An J, Nie Y, Xu Y. Structural insights into alcohol dehydrogenases catalyzing asymmetric reductions. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, 39: 366–379
  - 12 Aalbers F S, Fraaije M W. Design of artificial alcohol oxidases: Alcohol dehydrogenase-NADPH oxidase fusions for continuous oxidations. *ChemBioChem*, 2019, 20: 51–56
  - 13 Horecker B L, Kornberg A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J Biol Chem*, 1948, 175: 385–390
  - 14 Papamichael E M, Stamatis H, Stergiou P Y, et al. Enzyme kinetics and modeling of enzymatic systems. In: Singh R S, Singhanian R R, Pandey A, eds. *Advances in Enzyme Technology*. Amsterdam: Elsevier, 2019. 71–104
  - 15 Xia Q R. Construction of high efficient expression of 1,3-propanediol oxidoreductase and optimization of culture conditions of *Escherichia coli* (in Chinese). Master Dissertation. Quanzhou: Huaqiao University, 2006 [夏启容. 1,3-丙二醇氧化还原酶高效表达载体的构建及重组大肠杆菌的培养条件优化. 硕士学位论文. 泉州: 华侨大学, 2006]
  - 16 Li Z J. Directional evolution of glycerol dehydrogenase (in Chinese). Master Dissertation. Quanzhou: Huaqiao University, 2009 [李梓君. 甘油脱氢酶定向进化. 硕士学位论文. 泉州: 华侨大学, 2009]
  - 17 Brandt U. Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta-Bioenerget*, 1997, 1318: 79–91
  - 18 Zhong H P. Co-immobilization of glycerol dehydrogenase and coenzyme I (in Chinese). Master Dissertation. Xiamen: Xiamen University, 2011 [钟和平. 甘油脱氢酶和辅酶 I 的共固定化. 硕士学位论文. 厦门: 厦门大学, 2011]
  - 19 Pelz B, Žoldák G, Zeller F, et al. Subnanometre enzyme mechanics probed by single-molecule force spectroscopy. *Nat Commun*, 2016, 7: 10848
  - 20 Yu H, Siewny M G W, Edwards D T, et al. Hidden dynamics in the unfolding of individual bacteriorhodopsin proteins. *Science*, 2017, 355: 945–950
  - 21 Galenkamp N S, Biesemans A, Maglia G. Directional conformer exchange in dihydrofolate reductase revealed by single-molecule nanopore recordings. *Nat Chem*, 2020, 12: 481–488
  - 22 Xu B, Tao N J. Measurement of single-molecule resistance by repeated formation of molecular junctions. *Science*, 2003, 301: 1221–1223
  - 23 Venkataraman L, Klare J E, Nuckolls C, et al. Dependence of single-molecule junction conductance on molecular conformation. *Nature*, 2006, 442: 904–907
  - 24 Su T A, Neupane M, Steigerwald M L, et al. Chemical principles of single-molecule electronics. *Nat Rev Mater*, 2016, 1: 16002
  - 25 Xin N, Guan J, Zhou C, et al. Concepts in the design and engineering of single-molecule electronic devices. *Nat Rev Phys*, 2019, 1: 211–230
  - 26 Bruot C, Xiang L, Palma J L, et al. Effect of mechanical stretching on DNA conductance. *ACS Nano*, 2014, 9: 88–94
  - 27 Ruiz M P, Aragonès A C, Camarero N, et al. Bioengineering a single-protein junction. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 15337–15346
  - 28 Brisendine J M, Refaely-Abramson S, Liu Z F, et al. Probing charge transport through peptide bonds. *J Phys Chem Lett*, 2018, 9: 763–767
  - 29 Zhou X F. Study on the binding mechanism between alcohol dehydrogenase and NAD⁺/NADH on the basis of electrochemistry and FTIR analysis (in Chinese). Master Dissertation. Xiamen: Xiamen University, 2014 [周小芬. 基于电化学及傅里叶变换红外光谱的乙醇脱氢酶与辅酶 I 结合机制的研究. 硕士学位论文. 厦门: 厦门大学, 2014]
  - 30 Zhuang X, Zhang A, Qiu S, et al. Coenzyme coupling boosts charge transport through single bioactive enzyme junctions. *iScience*, 2020, 23: 101001
  - 31 Lu H P, Xun L, Xie X S. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, 1998, 282: 1877–1882

Summary for “氧化还原酶催化机理研究的沿革和新探”

The evolution and new exploration of the catalytic mechanism of oxidoreductase

Xiaoyan Zhuang¹, Aihui Zhang¹ & Baishan Fang^{1,2,3*}

¹ Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

² The Key Lab for Synthetic Biotechnology of Xiamen City, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

³ The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China

* Corresponding author, E-mail: fbs@xmu.edu.cn

Oxidoreductases play an important role in the metabolism of life so that revealing their catalytic mechanism is momentous for further reveal the influence of electron and proton transfer on the growth of living organisms. More importantly, oxidoreductase accounts for about one-third among all enzymes newly registered on the BRENDA website, of which half using NAD(P)H/NAD(P)⁺ as a coenzyme. Hugo Theorell is awarded a Nobel Prize in 1955 for achievements that discovered the nature and mode of action of oxidation enzymes in 1951. Cooperate with Britton Chance, they propose the famous Theorell-Chance mechanism based on the research of the catalysis kinetics mechanism of liver alcohol dehydrogenase, which has always been a hot topic since then. Thus, in the past 70 years, the study of the mechanism and its modification has always been a focus of researches since the classic oxidoreductase's catalysis mechanism is put forward in 1951. Based on the previous work, we review the evolution of the catalytic mechanism of oxidoreductases systematically and thus put forward two valuable scientific problems. (1) Do intracellular coenzymes bound to oxidoreductases enzymes have to dissociate after oxidation or reduction? (2) Do intracellular NAD(P)H-dependent oxidoreductases enzyme and its corresponding coenzyme have self-assembly? Then, we also detailed introduce some discoveries of oxidoreductases catalytic mechanism based on our recent work. Based on the whole-cell catalytic process of 1,3-propanediol oxidoreductase and glycerol dehydrogenase, we find that the whole-cell can also catalyze the extracellularly NAD⁺ to NADH. After then, technology development brings us advanced precise instruments, which give us a deeper insight into the catalyzation process at a single-molecular level. Among them, the STM-BJ (scanning tunneling microscope break junction) technique provides excellent performance in spatial resolution and electrical detection sensitivity, which has been one of the most frequently used techniques in single-molecule electrical detection in recent years. Thus, we provide the first demonstration of the STM-BJ technique for investigating charge transport through a single active enzyme junction, in which the binding of NAD⁺ with proteins boosts the charge transport by over 2100% than neutral FDH. Combine with site-specific mutagenesis, we demonstrate the conductance of FDH-NAD⁺ highly correlate with their bioactivities. And we will also employ it to study the real-time conductivity of single NAD(P)H-depending formate dehydrogenase in the catalytic process to reveal the new catalytic mechanism at the single-molecule level in future work. Studying the combination of single NAD(P)H-depending oxidoreductase and its co-enzyme and the reaction of substrate catalyzing is an original innovative research, which will help us to understand the essence of enzyme catalyzation in life activity and to improve technologies in directed enzyme evolution and development of biomedical drugs. The proposed catalytic mechanism of the NAD(P)H-depending oxidoreductase is expected not only to revolutionize the theory that has been followed for 70 years but also to improve a wide range of traditional technologies, such as whole-cell fermentation, multiple enzymes coupling catalyzation, enzyme activity detection, bio-sensor and so on.

oxidoreductases, catalytic mechanism, single-molecule enzyme, cofactor

doi: [10.1360/TB-2020-1304](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1304)