

L-山梨糖脱氢酶的纯化及性质的研究

薛震役 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要: 从 5L 罐发酵 L-山梨糖的 *Gluconobacter oxydans* SCB329 和 *Bacillus thuringiensis* SCB933 混合菌株中差速离心收集 SCB329 菌体, 破碎, 离心获得无细胞抽提液, 硫酸铵分级沉淀蛋白后依次经 DEAE Cellulose 52 和 Q Sepharose FF 柱层析分离得到了 L-山梨糖脱氢酶 (SDH), 它能将 L-山梨糖脱氢氧化为 L-山梨酮, SDS-PAGE 电泳测得分子量约为 60KD。动力学性质研究表明它为一个典型的 Michaelis-Menten 氏酶, 对 L-山梨糖作用的 K_m 值为 $52.7 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 对 DCIP 作用的 K_m 值为 $2.06 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 最适作用 pH 和温度分别为 7.0 和 42℃。 Mg^{2+} , Ca^{2+} 是酶的激活剂, Cu^{2+} 是酶的抑制剂, EDTA 对该酶也有明显的抑制作用。不同碳源对酶活的影响研究表明它在 SCB329 中是组成型表达。

关键词: 维生素 C, L-山梨糖, 2-酮基-L-古龙酸, L-山梨糖脱氢酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0089-04

STUDY ON THE PURIFICATION OF L-SORBOSE DEHYDROGENASE AND IT'S PHYSICAL CHEMICAL AND ENZYME PROPERTIES

XUE Zhen-Yi YIN Guang-Ling

(Shanghai Research Center of Biotechnology, CAS, Shanghai 200233)

Abstract: After the fractional precipitation by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the chromatography of DEAE Cellulose 52 and Q

Sepharose FF, the L-sorbose dehydrogenase has been purified from the cell free extract of the mixed culture of *Gluconobacter oxydans* SCB329 and *Bacillus thuringiensis* SCB933 in the fermentation of L-sorbose in 5L fermenter. Its MW is about 60KD in the SDS-PAGE electrophoresis. Dynamic studies demonstrates that it is a typical Michalis-Menten enzyme with K_m of $52.7 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ for L-sorbose and $2.06 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ for DCIP. Its optimal pH and temperature are 7.0 and 42°C respectively. Mg^{2+} and Ca^{2+} can activate the enzyme although Cu^{3+} and EDTA inhibit it. The L-sorbose dehydrogenase is conjectured a constitutive enzyme of *Gluconobacter oxydans* SCB329 by the analysis of the enzyme activity after the flask fermentation in the different carbon sources.

Key words: Vitamin C, L-sorbose, 2-KLG, L-sorbose dehydrogenase(SDH)

利用基因工程的手段构建基因工程菌和改良维生素 C(以下简称 V_c) 的生产方法, 已经成为近年来 V_c 研究领域的热门。1994 年, 日本的 Shinjoh 等人从液化醋杆菌 *Acetobacter liquefaciens* IFO12258 中克隆并表达了 L-山梨酮脱氢酶(SNDH)基因, 并在大肠杆菌中构建了 IFO12258 基因组文库^[1]。1990 年, Saito 等人从 *Gluconobacter oxydans* T-100 中分离纯化了 L-山梨酮脱氢酶(SNDH)和 L-山梨糖脱氢酶(SDH)^[2]; 1998 年, 他们又构建了 *G. oxydans* T-100 基因组文库, 将已纯化的 SDH 蛋白质氨基酸序列为基础合成核酸引物, 以 *G. oxydans* T-100 为模板, PCR 反应, 合成一段 180bp 的核苷酸序列。以该 PCR 产物为探针, 从文库中筛选出阳性克隆。测序后发现序列编码两个各为 1497 和 1599bp 的开放阅读框架, 分别对应 SDH 和 SNDH 基因。将克隆片段在大肠杆菌中表达, 测出的酶活力印证了克隆的正确性。构建穿梭载体在 *G. oxydans* E624 中表达, 结果表明 2-KLG 产量较 *G. oxydans* T-100 有较大提高^[3]。

在不断完善我国特有的“两步发酵法”的研究中, 我们实验室已经通过 PCR 技术克隆到了 SNDH 基因, 并在 *E. coli* 中获得了成功表达^[4]。在此基础上, 我们深入研究了产酸“小菌”SCB329 在混合发酵中的代谢途径, 从 SCB329 中分离到了国外一些实验室所报道的 SDH 酶, 它可以催化 L-山梨糖转化为 L-山梨酮, 进而由 L-山梨酮脱氢酶催化生成 2-KLG—— V_c 生产的重要前体。因此, 深入了解 SDH 与之催化的氧化还原反应, 对提高 V_c 发酵的转化率及最终

构建成功直接利用 D-山梨醇发酵生产 V_c 的基因工程菌有着重要的理论意义和经济价值。本文对 SDH 进行了分离纯化, 并初步研究了 SDH 的理化及酶学性质, 通过免疫学方法得到了 SDH 的抗体, 为下一步从文库中筛选 SDH 基因及最终构建成功直接利用 D-山梨醇的基因工程菌打下了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌种: *Gluconobacter oxydans* SCB329 (“小菌”), *Bacillus thuringiensis* SCB933 (“大菌”)均由本实验室保存^[5]。

1.1.2 化学试剂: 2, 6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) 为 Sigma 公司产品; L-山梨糖为上海生物化学试剂公司产品; 靛氏佐剂购于华美公司。

1.1.3 纯化材料: DEAE Cellulose 52 购于华美公司; Q Sepharose Fast Flow 购于安发玛西亚生物技术有限公司。

1.1.4 混合菌种子培养基: L-山梨糖 1.5g, 葡萄糖 0.2g, 蛋白胨 0.5g, 酵母粉 0.5g, 玉米浆 0.3g, 尿素 0.4g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, CaCO_3 0.4g, 定容 1L。pH6.8~7.0。混合发酵培养基: L-山梨糖 7g, 玉米浆 2g, 尿素 0.1g, CaCO_3 0.05g, KH_2PO_4 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, pH6.8~7.0, 定容 1L。

1.2 方法

1.2.1 无细胞抽提液的制备: 将经过活化的混合菌种(*G. oxydans* & *B. thuringiensis*)240mL 接种至 5L NBS 自动发酵罐培养 18h 后, 发酵液经 2000r/min 离心 10min 以去除杂质和大菌,

然后 8000r/min 离心 20min 收集小菌菌体, 用 10mmol/L 磷酸钾 (pH = 7.0) 缓冲液洗涤两次后悬浮在同样缓冲液中, 超声波破碎 30min, 于 16,000r/min 离心 60min, 收集上清, 即得无细胞抽提液。

1.2.2 L-山梨糖脱氢酶活性的测定: 测定酶活性的基本反应液由 3mL 含 0.3% Triton X-100 的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH = 7.0)、0.45mL 的 2.5mmol/L DCIP 溶液和 4.95mL H₂O 组成, 于测定前现配。取 0.4mL 基本反应液、0.1mL 1mol/L 山梨糖溶液置于 1cm 光程的石英比色皿中, 25℃ 温育 5min 后加入 10uL 酶液, 测定第 1 分钟内 600nm 的光吸收变化率。根据标准曲线换算成 DCIP 浓度变化, 计算酶活力。一个酶活力单位 (U) 定义为每分钟催化还原 1umol DCIP 的酶量^[6]。

1.2.3 蛋白质的定量测定: 参见文献 [7]。

1.2.4 L-山梨糖脱氢酶的分离纯化: 所有步骤均在 4℃ 层析冷柜内进行。无细胞抽提液中加入 (NH₄)₂SO₄ 至 30% 饱和度, 0℃ 静置 30min 后 15,000r/min 离心 30min, 上清液中继续加 (NH₄)₂SO₄ 至 70% 饱和度, 0℃ 静置 30min 后离心 30min 收集沉淀, 溶于尽可能少的磷酸钾缓冲液 (pH = 7.0) 中, 透析过夜。透析液依次进行以下层析:

(1) DEAE Cellulose 52 柱 (30mm × 180mm), 缓冲液: 10mmol/L 磷酸钾, pH7.0; 0~0.5mol/L NaCl 梯度洗脱, 0.4mol/L 左右收集到酶活性峰。

(2) Q Sepharose Fast Flow 柱 (10mm × 150mm), 缓冲液: 10mmol/L 磷酸钾, pH6.3; 0~0.5mol/L NaCl 梯度洗脱, 0.1~0.2mol/L 收集到酶活性峰。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析: 参见文献 [8]。

1.2.6 抗体的获得及检测: 按文献 [8] 方法 15% SDS-PAGE 电泳, 上样量约含 100μg 酶蛋白, 电泳后切下含蛋白的胶条, 溶于 0.75mL H₂O 中, 等体积加入氟氏佐剂, 乳化后直接皮下注射兔子, 5 周后加强免疫 1 次, 以后每隔 2 周继续加强免疫 1 次, 加强免疫 2~3 次后, 间接

ELISA 反应测定抗体效价^[9]。

2 结果与讨论

2.1 L-山梨糖脱氢酶的分离纯化

如图 1、2 所示, SCB329 的无细胞抽提液通过硫酸铵分级沉淀, 离子交换柱层析等步骤对 SDH 蛋白进行了纯化。

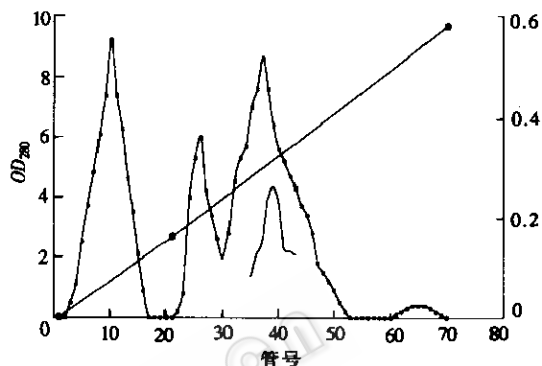


图1 DEAE Cellulose 52柱层析结果

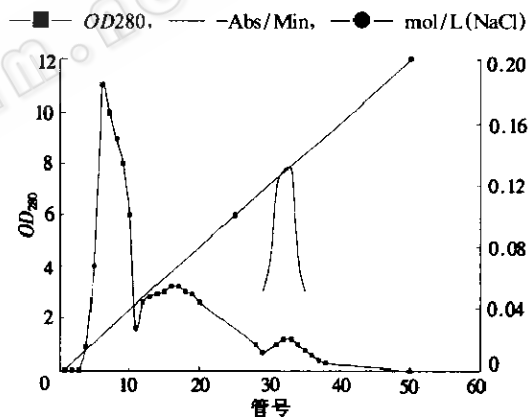


图2 Q Sepharose FF柱层析结果

—■— OD280, — — Abs/Min, —●— mol/L (NaCl)

经三步分离后比活力从 11.6U/mg 提高到 690.1U/mg, 纯化了约 60 倍。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 仅呈现一条带, 分子量约为 60kD, 与文献中报道的一致。

2.2 L-山梨糖脱氢酶的催化性质

2.2.1 底物 L-山梨糖和 DCIP 对酶活性的影响: 分别测定 20mmol/L 到 320mmol/L 不同浓度下 L-山梨糖和 5 × 10⁻³ mmol/L 到 0.1mmol/L 下 DCIP 对酶初速度的影响, 双倒数作图求 K_m 值, 初速度以标准酶活的测定值为相对速度代替^[10]。最后求得酶对 L-山梨糖和 DCIP 的 K_m 值分别

为 $52.7 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 和 $2.06 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

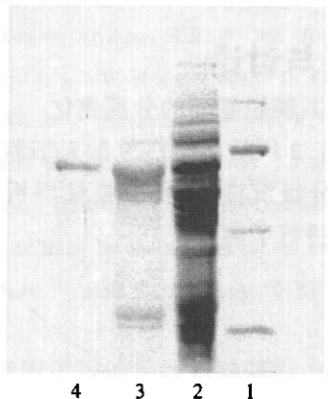


图3 SDH逐级分离纯化后SDS-PAGE电泳图

Lane 1: Marker, 97.4kD, 66.2kD, 43kD, 31kD

Lane 2: 硫酸铵分级沉淀后

Lane 3: DE 52柱层析收集活性峰

Lane 4: Q柱层析收集活性峰

2.2.2 温度对酶活性及稳定性的影响: 通过在不同温度维持 15min 检测 SDH 酶活性的方法, 追踪了 15℃ 至 45℃ 范围内的酶活变化趋势。SDH 的最适温度为 42℃, 在 35℃ 以上酶依然保持一定稳定性, 但酶在 35℃、50℃ 各温育 5min 后, 分别失去 50% 和 90% 的活性。

2.2.3 pH 对酶活性的影响: 在 25℃ 条件下, 测定了 SDH 酶促反应速度与溶液中离子 pH 值的关系, 得出其最适作用 pH 在 7.0 附近。

2.2.4 金属离子对酶活性的影响: 参照标准酶活测定的方法, 酶溶液加入到基本反应液后, 再加入一定量金属离子, 搅动, L-山梨糖加入后立即测定酶活。实验发现, Cu^{2+} , EDTA 抑制了酶的活性, 而 Mg^{2+} , Ca^{2+} 是酶的激活剂。

2.3 酶的诱导

在 L-山梨糖、D-葡萄糖、甘油、D-甘露醇、D-山梨醇、D-半乳糖等不同碳源条件下, “小菌”培养 48h 后收集菌体, 破碎细胞后测定酶活, 不同碳源下酶的活性变化不大, 因此, SDH 在“小菌”中应该是组成型表达。

此外, 本实验室在克隆到 SNDH 基因并在 *E. coli* 中成功表达的同时, 对“小菌”SCB329 的基因组进行了初步研究, 已取得了较好的进展。从上述实验结果可见, 我们已经纯化出了 L-山梨糖脱氢酶, 并对酶的性质作了初步的研究, 用免疫学的方法获得了 SDH 的抗体, 间接 ELISA 反应测得抗体滴度为 10,000 以上。目前, 在混合发酵生产 V_c 的领域, 除了沈阳应用生态研究所关于 2-KLG 还原酶的研究报道外, 国内还未见有产酸“小菌”代谢途径中重要酶的研究报道。所以, 系统地研究我国特有的“两步发酵法”中产酸“小菌”的关键酶, 从 SCB329 基因文库中筛选 SDH 基因, 及最终构建直接利用 D-山梨醇发酵产生 2-KLG 的基因工程菌, 将填补我国在这一领域的空白, 对实现简化 V_c 生产工艺也有着重要的理论意义和潜在的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Masako Shinjoh, Noribumi Tomiyama. Applied and Environmental Microbiology, Feb, 1995, 413~420.
- [2] Yoshimasa Saito, Yoshinori Ishinori. Applied and Environmental Microbiology, Feb, 1997, 454~460.
- [3] Yoshimasa Saito, Yoshinori Ishinori. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 58:309~315.
- [4] 郭新友, 尹光琳. 微生物学通报, 1998, 25(3): 139~143.
- [5] 尹光琳, 何建明, 任双喜等. 工业微生物, 1997, 27(1): 1~7.
- [6] Teruhide Sugisawa, Tatsuo Hoshino. Agri. Biol. Chem., 1991, 55(2):363~370.
- [7] Bradford M M, Anal. Biochem, 1976, 72:248~254.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] F. 奥斯伯, R. 布伦特等. 精编分子生物学实验指南, 1998, 432~434, 415~416.
- [10] 张树政, 孟广震, 何忠效等. 酶学研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987, 139~146.