

文章编号: 1000-5013(2009)01-0062-05

克雷伯杆菌 1,3-丙二醇氧化还原酶的分离纯化及其酶学性质

陈宏文, 聂金峰, 方柏山

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 在有氧条件下,利用 DEAE Sepharose Fast Flow 弱阴离子离子交换层析和 Blue Sepharose CL-6B 亲和层析,同时分离并提纯克雷伯杆菌胞内的 1,3-丙二醇氧化还原酶和甘油脱氢酶.研究表明,1,3-丙二醇氧化还原酶的纯化倍数为 35.86 倍,回收率为 5.17%,该酶最适表观反应温度为 57℃,最适反应 pH 值为 9.5.在 30℃ 及 pH=8.0~10.0 时,该酶具有良好的稳定性.在 45℃ 和 pH=9.5 条件下,该酶以 1,3-丙二醇和 NAD⁺ 为底物,其米氏常数 K_m 分别为 15.8,0.2 mmol·L⁻¹.1,3-丙二醇氧化还原酶对生理反应底物 3-羟基丙醛活性最大,对其他醇类也有氧化能力. Mn²⁺ 对酶有显著激活作用,巯基保护剂能明显提高酶的活力.

关键词: 1,3-丙二醇氧化还原酶;克雷伯杆菌;甘油脱氢酶;酶学性质;纯化

中图分类号: TQ 923; Q 554.03

文献标识码: A

1,3-丙二醇是一种重要的化工原料,它最主要的用途是作为新型聚酯(如聚对苯二甲酸丙二醇)、聚酯和聚亚氨酯的单体^[1].1,3-丙二醇的生产方法有化学法和生物转化法.近年来,生物转化法以其利用可再生资源、对环境友好等特点日益受到人们的重视.1,3-丙二醇氧化还原酶又称 1,3-丙二醇脱氢酶(PDOR,EC 1.1.1.202),是甘油转化为 1,3-丙二醇的厌氧发酵途径中关键酶之一,能催化一系列还原反应和氧化反应^[1].依赖辅酶 NAD⁺ 的 PDOR 主要来源于克雷伯杆菌属、柠檬菌属及梭状芽孢杆菌属等,而且,大多数用于制备这种酶的细菌是需要严格厌氧培养的.迄今为止,未见有对该酶晶体结构的报道,也不能在蛋白质数据库(PDB)中搜索到该酶的结构信息.研究发现,克雷伯杆菌(兼性厌氧菌)中甘油脱氢酶(GDH)和 PDOR 对氧气有一定耐受力^[2].本文在有氧条件下,利用离子交换层析和亲和层析,同时分离和提纯了克雷伯杆菌胞内 PDOR 和 GDH,并考察 PDOR 的酶学性质.

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

ÄKTA Purifier 100 制备型全自动液相色谱系统, XKI6/20 色谱柱, DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析和 Blue Sepharose CL-6B 亲和层析的介质(瑞典安玛西亚公司); J Y92- 型超声波细胞粉碎机(浙江宁波新芝生物科技股份有限公司); UV-2401(PC) S 型联机紫外可见分光光度计, TB-85 型恒温水浴装置(日本岛津公司); 3 K30 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司). 3-羟基丙醛(自制)^[3], 其他试剂购自上海化学试剂公司,均为市售分析纯或化学纯.

1.2 菌种和培养

克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae* DSM 2026, 德国生物技术中心曾安平博士赠送). 相关的细胞培养和无细胞抽提液制备方法参见文[2].

收稿日期: 2008-04-15

作者简介: 方柏山(1957-),男,教授,主要从事合成生物学的研究. E-mail: bsfang@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2007CB707804); 国家高技术研究发展(863)计划项目(2006AA-020103); 国家自然科学基金资助项目(20676048); 福建省自然科学基金计划资助项目(E0510018)

1.3 酶活力测定

GDH,PDOR 酶活力用初速度法测定,参考文[1]的方法并适当修改^[4].1.5 mL GDH 酶活力分析反应液中含有 30 mmol · L⁻¹的(NH₄)₂SO₄,0.2 mol · L⁻¹甘油,2 mmol · L⁻¹ NAD,1 μmol · L⁻¹的 Fe(NH₄)₂(SO₄)₂,0.1 mol · L⁻¹碳酸钾缓冲溶液(pH = 12.0).在 45 °C 条件下,加入适量酶液启动反应,在紫外分光光度计(λ = 340 nm)下测定吸光度变化(NADH 形成).PDOR 酶活力测定以 1,3-丙二醇为底物(碳酸钾缓冲溶液 pH = 9.5),其余同 GDH 的酶活测定.酶活力定义:在上述条件下,每秒钟催化 1 mol 底物转化为产物所需的酶量为 1 kat.酶的比活力为每克蛋白所含酶的单位数(kat · g⁻¹).

1.4 蛋白质测定

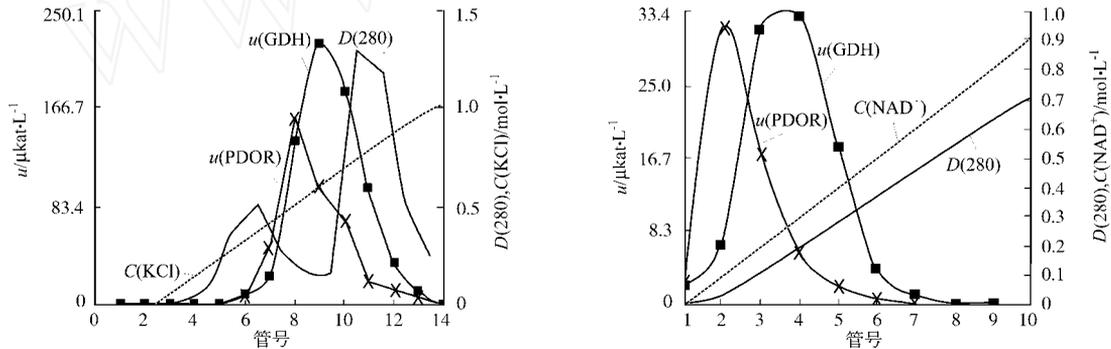
蛋白质采用 Bradford 法测定^[5],以牛血清白蛋白为标准蛋白.

2 结果和讨论

2.1 酶的分离与纯化

2.1.1 离子交换层析 取 6 mL 的无细胞抽提液,上样到已被 50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.4,含 2 mmol · L⁻¹二硫代苏糖醇)充分平衡的 1 mL 的 DEAE Sepharose Fast Flow 预装柱.采用 10 个柱体积的 0~1 mol · L⁻¹ KCl 进行线性梯度洗脱,流速为 1 mL · min⁻¹,每管分部收集 1 mL,分别测定各管 GDH,PDOR 的酶活.GDH,PDOR 在 KCl 浓度约 0.3~0.6 mol · L⁻¹处得到洗脱,两条洗脱曲线几乎重叠,如图 1(a)所示.

2.1.2 亲和层析 合并经离子交换洗脱具有较高 GDH,PDOR 酶活力的洗脱液,上样到 Blue Sepharose CL-6B 层析柱(1.6 cm × 4 cm).用 10 个柱体积的 0~2 mmol · L⁻¹ NAD⁺进行线性梯度洗脱,流速为 2 mL · min⁻¹,每管分部收集 4 mL,分别测定各管酶活.PDOR,GDH 分别在 NAD⁺浓度 0.1,0.3 mmol · L⁻¹处得到两个洗脱酶峰,2 号管为 PDOR 洗脱峰,4 号管为 GDH 洗脱峰,两条洗脱曲线部分重叠,如图 1(b)所示.



(a) 离子交换层析

(b) 亲和层析

图 1 不同方法的酶分离洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of enzymes separation with different methods

经过上述步骤,纯化过程中蛋白质质量浓度及酶活力变化如表 1 所示.表 1 中, m_T 为总蛋白质质量,

表 1 克雷伯杆菌 PDOR 和 GDH 的纯化

Tab.1 Purification of PDOR and GDH from *Klebsiella pneumoniae*

酶	步骤	m_T /mg	u /μkat	/g · L ⁻¹	/μkat · g ⁻¹	/%	n
PDOR	粗提液	108.18	2.428	18.03	22.5	100.00	1.00
	离子层析交换	8.66	0.929	1.24	111.2	39.65	4.95
	亲和层析(4号管)	0.16	0.126	0.04	804.0	5.17	35.86
	亲和层析(2号管)	0.18	0.023	0.05	124.0	0.94	5.52
GDH	粗提液	108.18	2.366	18.03	21.8	100.00	1.00
	离子层析交换	8.66	1.662	1.24	191.9	70.22	8.77
	亲和层析(4号管)	0.18	0.133	0.05	720.1	5.60	32.92
	亲和层析(2号管)	0.16	0.027	0.039	171.4	1.13	7.84

为蛋白质质量浓度, u 为总酶活, v 为酶的比活力, w 为回收率, n 为纯化倍数. 由表 1 可知, PDOR, GDH 的纯化倍数和回收率分别为 35.86, 32.92 倍和 5.17%, 5.60%. 2, 4 号管仍残留极少量的 GDH 和 PDOR 酶活, GDH 和 PDOR 基本分离. 以 2 号管中的 PDOR 继续研究酶学性质.

2.2 1,3-丙二醇氧化还原酶的酶学性质

2.2.1 最适反应温度及热稳定性 在 1.5 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钾缓冲溶液 ($\text{pH} = 9.5$) 的测酶活力体系中, 测定温度 (θ) 对酶活力的影响, 如图 2(a) 所示. 图 2 中, σ 为相对活力. 从图 2(a) 可知, PDOR 酶活力随温度升高逐渐增加, 在 57 $^{\circ}\text{C}$ 时, PDOR 活力最大, 继续升高温度, 酶相对活力则急剧下降. 说明 PDOR 能在较高的温度下进行反应.

取一定量的酶液在不同温度下分别保温 30, 100, 240 min 后, 迅速冷却至室温. 取出 100 μL 经过处理的酶液, 加入到 45 $^{\circ}\text{C}$ 的测活体系中反应, 测定酶的残余活力, 结果如图 2(b) 所示. 设酶失活符合一级失活动力学方程, 则 30, 45 $^{\circ}\text{C}$ 的酶活力半衰期分别为 14.4, 1.2 h, 说明 PDOR 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 具有较好的热稳定性. 在实际的反应中, 兼顾酶的最适反应温度和热稳定性, 反应温度选用 30 ~ 45 $^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温缓冲液体系 ($\text{pH} = 6.0 \sim 8.0$, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液; $\text{pH} = 9.0 \sim 12.0$, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钾缓冲液) 中, 考察 pH 值对酶活力的影响, 如图 2(c) 所示. 结果表明, PDOR 的最适反应 pH 值为 9.5.

取一定量的酶液分别加入到等体积的不同 pH 值缓冲液 (同上) 中, 45 $^{\circ}\text{C}$ 保温 120 min. 取出 100 μL 经过处理的酶液, 加入到 45 $^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 9.5$ 的测活体系中反应, 测定酶的残余活力, 考察了 PDOR 的 pH 值稳定性, 如图 2(d) 所示. 结果表明, 在 $\text{pH} = 7.0 \sim 10.0$ 时, 酶保持了较高的稳定性, pH 值继续增加, 酶活力损失较大; 当 pH 值为 12.0 时, 残余酶活力为 60% 左右.

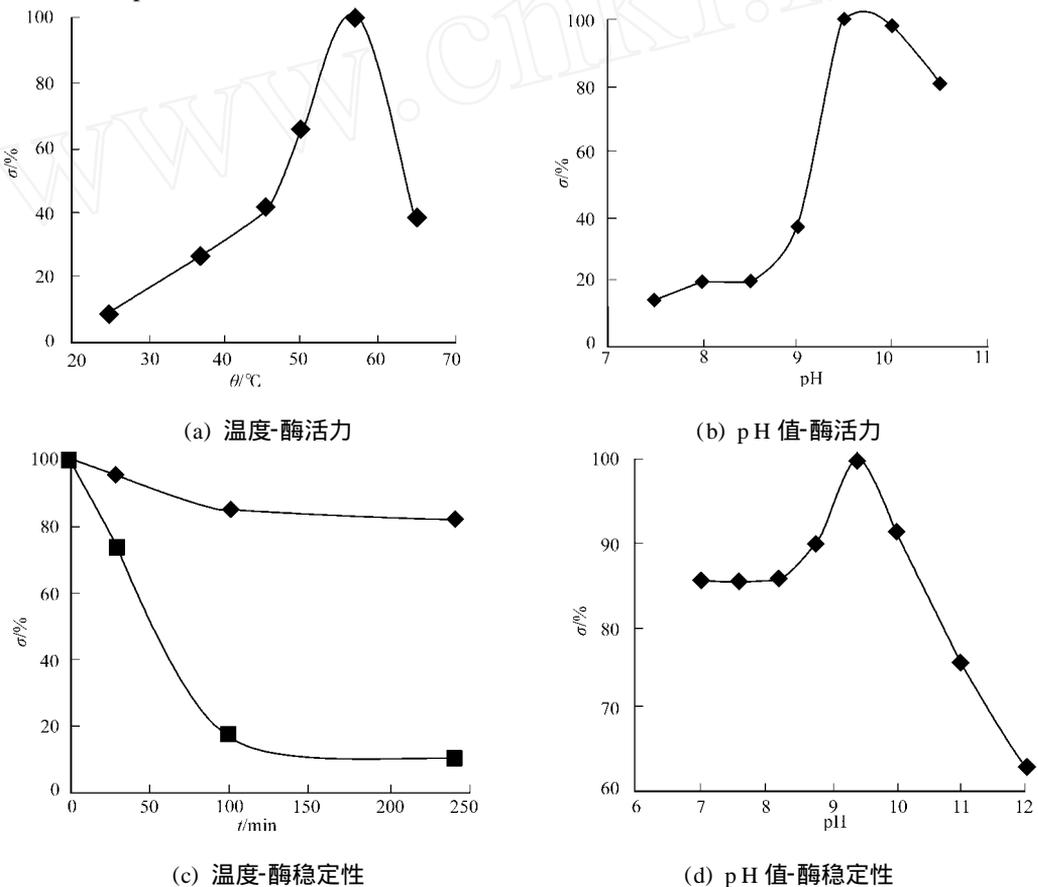


图 2 温度和 pH 值对 PDOR 活性和稳定性的影响

Fig. 2 Effects of temperature and pH on the activity and stability of 1,3-propanediol oxidoreductase

2.2.3 动力学参数 在 $\text{pH} = 9.5$ 和反应温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 测定不同底物浓度 (另一种底物为酶和浓度) 下的酶活力, 以流量 V 和浓度 C 作 Lineweaver Burk 双倒数图, 如图 3 所示. 这里测的是 PDOR 的氧化反应, 以 1,3-丙二醇和 NAD^+ 为底物. 从图 3 可得到, 1,3-丙二醇和 NAD^+ 的米氏常数 K_m 值分

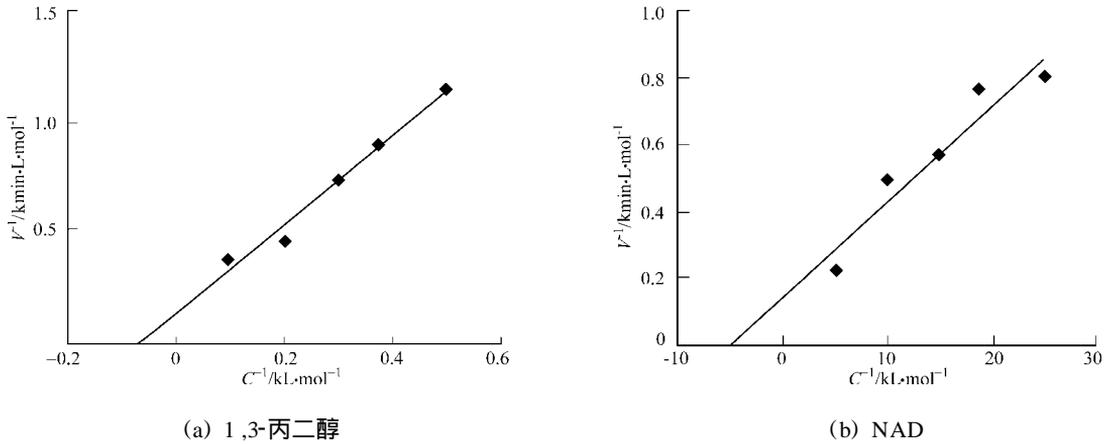


图 3 双倒数法测 PDOR 的 K_m 值

Fig. 3 Double reciprocal plot for K_m value of PDOR

别为 $15.8, 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而两者的 V_{\max} 值分别为 $7.76, 6.85 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$. 结果表明, K_m 值均大于来源于 *Clostridium butyricum*^[6], *Citrobacter freundii*^[7], *Lactobacillus brevis*^[8] 等 PDOR 的 K_m 值. 文献报道 NAD^+ 的 K_m 值范围大致为 $0.076 \sim 0.370 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.2.4 酶对几种底物的相对活力 选择 3-羟基丙醛(3-HPA)、甘油、1,2-丙二醇及其他结构相似的醇类作为底物,3-HPA 浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,其他底物浓度均为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,反应液中还含有 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NADH 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液($\text{pH} = 9.5$). 以 3-HPA 酶活力为 100%,考察 PDOR 对几种底物的相对活力($\%$),结果如表 2 所示. 由表 2 可知,PDOR 对生理反应底物 3-HPA 活性最大,其次是正戊醇、正丙醇、乙二醇、1,4-丁二醇. PDOR 相对较低的底物专一性与已知的大多数 PDOR 一致. PDOR 对乙醇、1,3-丁二醇、1,2-丙二醇、甲醇、异丙醇以及糖醇活性则很低.

表 2 PDOR 对几种底物的相对活力比较

Tab. 2 Substrate specificity of PDOR

底物	/ %	底物	/ %	底物	/ %
3-羟基丙醛	100	乙醇	2	正丙醇	15
甘油	11	甲醇	5	异丙醇	5
1,2-丙二醇	4	1,3-丁二醇	3	正戊醇	21
乙二醇	14	1,4-丁二醇	12	木糖醇	0

2.2.5 金属离子对酶的影响 在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含有不同一价、二价金属离子的氯盐反应液中,考察金属离子对酶活力的影响,结果如表 3 所示. 反应液中还含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1,3-丙二醇, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAD^+ 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液($\text{pH} = 9.5$),以不另外添加金属离子为对照(酶活力为 100%).

表 3 金属离子对 PDOR 的影响

Tab. 3 Effects of metal ions on PDOR

阳离子	/ %	阳离子	/ %
对照组	100	Mn^{2+}	312
NH_4^+	112	Mg^{2+}	65
Na^+	80	Ca^{2+}	24
Li^+	101	Fe^{2+}	134

由表 3 可知, Mn^{2+} 对 PDOR 有明显激活作用,这与 *Clostridium butyricum*^[5], *Lactobacillus brevis*^[7], *Lactobacillus buchneri*^[7] 中的 PDOR 一致. Fe^{2+} , NH_4^+ 及 Li^+ 对 PDOR 也有一定的激活作用, Ca^{2+} , Mg^{2+} 和 Na^+ 表现出 24% 至 80% 的相对活力. 在实验中加入 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的巯基保护剂如二硫苏糖醇(DTT),发现巯基保护剂能明显提高 PDOR 酶活力. 说明 PDOR 的活性中心可能含有巯基,受到 DTT 的保护后,酶活力可免遭氧化破坏.

3 结束语

在有氧条件下,利用 DEAE Sepharose Fast Flow 弱阴离子离子交换层析和 Blue Sepharose CL-6B 亲和层析,同时分离并提纯克雷伯杆菌胞内 PDOR 和 GDH. 与文献报道的严格厌氧条件或经多步纯化

只得到一种关键酶相比,更便于实际操作.实验结果表明,PDOR的纯化倍数和回收率分别为35.86倍和5.17%.该酶最适表观反应温度和最适反应pH分别为57和9.5.在30及pH=8.0~10.0时,该酶具有良好的稳定性.

参考文献:

- [1] AHRENS K, MENZEL K, ZENG A P, et al. Kinetic dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture (): Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation [J]. *Biotech Bioeng*, 1998, 59(5):544-552.
- [2] 陈宏文,王蔚,方柏山,等.克雷伯杆菌生产1,3-丙二醇关键酶发酵条件研究[J]. *高校化学工程学报*, 2004, 18(5):621-627.
- [3] 陈宏文,洪其文,徐晶,等.克雷伯杆菌有氧发酵利用甘油生产3-羟基丙醛的研究[J]. *现代化工*, 2004, 24(11), 36-39.
- [4] 陈宏文,王蔚,方柏山,等.克雷伯杆菌生产1,3-丙二醇关键酶酶活分析方法研究[J]. *广州食品工业科技*, 2004, 20(3):5-9.
- [5] 汪家政. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000:42-47.
- [6] MALAOUI H, MARCZA K R. Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild type and mutant D[J]. *Appl Microbiol*, 2001, 90:1006-1014.
- [7] DANIEL R, BOENIGK R, GOTTSCHALK G. Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1995, 177:2151-2156.
- [8] VEOGA-DA-CUNHA M, FOSTER M A. 1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:2005-2010.

Purification and Characterization of 1,3-Propanediol Oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae*

CHEN Hong-wen, NIE Jin-feng, FANG Bai-shan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae* was purified by DEAE sepharose fast flow ion-exchange chromatography and Blue Sepharose CL-6B affinity chromatography under aerobic conditions. A 35.86-fold purification was obtained with the recovery of 5.17% activity. The optimum temperature and pH of the enzyme activity were 57 and 9.5 of pH value. At 30 and at range of pH 8.0~10.0, 1,3-propanediol oxidoreductase was stable. At 45 and pH 9.5 the K_m for 1,3-propanediol and NAD⁺ were 15.8 mmol · L⁻¹ and 0.2 mmol · L⁻¹, respectively. The enzyme oxidized other alcohols such as pentanol, propanol, ethylene glycol and 1,4-butanediol, besides physiological substrate 3-hydroxypropionaldehyde. The enzyme was significantly activated by Mn²⁺. Reducing agents were able to enhance the activity of 1,3-propanediol oxidoreductase.

Keywords: 1,3-propanediol oxidoreductase; *Klebsiella pneumoniae*; characterization; purification

(责任编辑:黄仲一 英文审校:陈国华)