

2-酮-L-古龙酸还原酶分离纯化及其理化、酶学性质的研究

蒋宇扬 郭振勇 张成刚

(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

摘 要 从发酵 L-山梨糖的 *Gluconobacter oxydans* 和 *Bacillus megaterium* 2980 混和菌株的无细胞抽提液中分离到了 2-酮-L-古龙酸还原酶(KGR),测得其分子量为 90kDa。动力学性质研究表明它为一个典型的 Michaelis-Menten 氏酶,对 2-酮-L-古龙酸作用的 K_m 值为 3.42×10^{-3} mol,最适作用 pH 为 6.5,最适作用温度为 30℃。2-酮-L-古龙酸还原酶的合成不受 L-山梨糖和 2-酮-L-古龙酸的诱导,故推测 2-酮-L-古龙酸还原酶是 *Gluconobacter oxydans* 的一个组成酶。

关键词 维生素 C, L-山梨糖, 2-酮-L-古龙酸, 2-酮-L-古龙酸还原酶

目前维生素 C 的生产,国际上主要有莱氏法和我国的二步发酵法。由于莱氏法为全化学合成,存在严重环境污染及反应步骤过长的不足,而我国二步发酵法避免了这些缺点^[1,2]。所以,二步发酵法更为世界各生产厂家所关注。在不断完善二步发酵法的研究中,我们分离到了国外一些实验室所报道的^[3,4]2-酮-L-古龙酸还原酶(以下简称 KGR)。它可催化 Vc 合成前体 2-酮-L-古龙酸还原成艾杜糖酸,同时该反应也是 L-山梨糖整个生物发酵转化中唯一的还原反应。因此还原副反应直接影响着 Vc 二步发酵的转化率,所以深入了解 KGR 与之催化的还原反应,对提高 Vc 二步发酵的转化率有着重要的理论意义和经济价值。本文对 KGR 进行了分离纯化,并初步研究了 KGR 的理化及酶学性质。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株: Vc 二步发酵 2-酮-L-古龙酸生产菌:氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的混合菌株 2980 保藏菌株,东北制药厂提供。

1.1.2 L-山梨糖发酵培养基(%): 玉米浆 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $CaCO_3$ 0.5, KH_2PO_4 0.1, L-山梨糖 8, 尿素 1.5, pH7.6~8.0。

1.1.3 药品分离材料: L-山梨糖, 2-酮-L-古龙酸标准品, 东北制药总厂提供, DEAE Sephecal, Sephadex G100, SepharcylS200 及 NADH 购于 Pharmacia。

1.2 方法

1.2.1 无细胞抽提液的制备: 将经过活化的 2-酮-L-古龙酸生产菌(*G. oxydans* & *B. megaterium*) 2980 接种至 5L 自动发酵罐培养 24h 后, 发酵液经 6500g 离心 5min, 收集菌体, 用含 0.025mol/L KCl 的 0.025mol/L Tris·HCl 缓冲液(pH 7.2)洗涤两次后悬浮在

缓冲液中,超声波(珠江-250A型,屏极电流260mA)破碎30min,于30 000g离心3h,收集上清,即得无细胞抽提液。

1.2.2 KGR活性测定:将0.05mol/L磷酸缓冲液(pH7.2),待测酶液,0.02mol/L NaOH溶液和25% 2-酮-L-古龙酸分别在超级恒温水浴中于30℃保温30min。取1.0ml酶液,0.1ml NaOH溶液置于1cm光程的石英比色池中,以磷酸缓冲液补充至2.7ml,最后加入0.3ml 2-酮-L-古龙酸溶液,总体积4.1ml于340nm立即测定光吸收值(A)的变化,每间隔30s读一次,反应5min,以每60s引起0.001个OD值下降作为KGR的一个酶活力单位,以时间为横坐标,OD值变化为纵坐标,计算直线斜率K。

活力单位 = $1000 \times K \times D \times V$

D:测定前酶液稀释倍数

V:测定用酶液ml数

1.2.3 2-酮-L-古龙酸含量测定:取发酵液2ml,加入28mol/L H₂SO₄ 2ml,准确煮沸30min,以1%淀粉作指示剂,用0.1mol/L I₂溶液滴定(30s不退色为准)

2-酮-L-古龙酸含量(mg/ml) = $7.6916 \times V$ (0.1mol/L I₂的消耗量ml)

1.2.4 KGR蛋白分子量及蛋白浓度的测定:测定方法见文献[5,6]。

1.2.5 KGR蛋白的分离提纯:将2-酮-L-古龙酸无细胞抽提液(CFEI)以45 000g离心3h,收集上清(CFEII),依次进行以下层析:

1)DEAE-11纤维素柱(φ26mm×340mm),缓冲液:0.025mol/L Tris·HCl pH7.2; 0.025mol/L KCl;梯度范围:0.2~0.5 mol/L KCl;洗脱速度:90ml/h;酶蛋白在0.25'~0.37mol/L KCl处被洗脱下来(DEAE-11)酶活最高峰在0.27 mol/L KCl。

2)DEAE-Sephecal柱(φ20mm×160mm),缓冲液:同上;梯度范围0.2~0.35mol/L KCl;洗脱酶蛋白(DEAE-S)范围0.22~0.24mol KCl;速度同上。

3)Sephadex G100(φ20mm×800mm),缓冲液:同上;速度7.5ml/h,酶蛋白(G-100)活性峰出现在41~49ml处。

4)Sephacry S200(φ20mm×800mm),缓冲液:同上;速度:30ml/h,样品峰(S-200)出现在320~430ml处。活性峰380~392ml。

2 结果和讨论

2.1 KGR的分离纯化

如图1、图2所示,KGR经两次离子交换,两次凝胶过滤后,其蛋白洗脱峰与活性峰重合,聚丙烯酰胺凝胶电泳显示蛋白一条带,分子量为90kDa。说明获得了纯品KGR。表1给出各步分离纯化后的酶活,蛋白浓度,比活、收率和提纯倍数。

2.2 KGR的动力学性质

定义在30℃,pH7.2条件下,每分钟在340nm处引起一个OD值下降,为一个反应速度。以下图表均以*v*表示。

2.2.1 底物2-酮-L-古龙酸浓度对KGR活性的影响:KGR动力学研究是以DEAE-11纤维素柱层析纯化的酶为基础,从图3可以看出KGR反应速度与底物2-酮-L-古龙酸浓度的关系,双例数作图亦表明KGR为一典型Michaelis-Menten氏酶,对2-酮-L-古龙酸的

K_m 值经计算为 $3.42 \times 10^{-3} \text{mol}$.

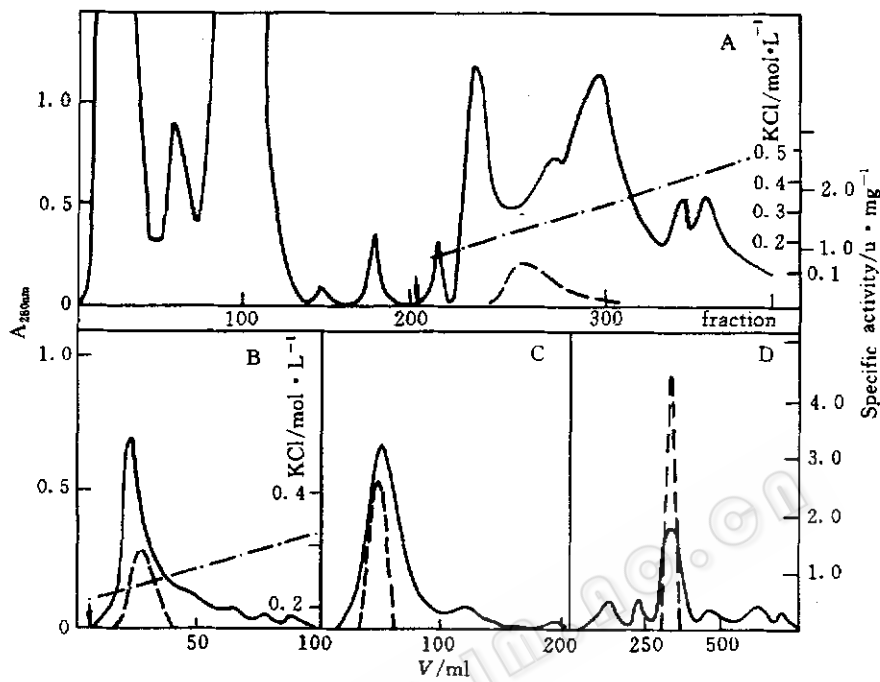


图 1 从混菌 2980 的无细胞抽提液逐级分离纯化 KGR

Fig.1 Elution profiles of 2-Keto-gulonate reductase in a series of purification

A. Elution profile of KGR in a DEAE-11 column, after sample application, the column was eluted with buffer, followed by elution with a linear gradient of KCl.

..... indicates the fractions contain KGR activity.

the arrow indicates the beginning of elution with the gradient - - - - -

B. Elution profile of KGR in DEAE Sephacal.

C. Elution profile of KGR in Sephadex G100.

D. Elution profile of KGR in Sephacryl S200.

表 1 2-酮-L-古龙酸还原酶的分离纯化

Table 1 Purification of 2-Keto-L-gulonate reductase

Puri. stage	Volume /ml	Protein conc. /mg·ml ⁻¹	Activity /u·ml ⁻¹	Specific activity /u·mg ⁻¹	Yield /%	Purification /Fold
CFE I	135	8.15	21725	2666	-	-
CFE II	129	6.50	21125	3250	92.9	1.2
DE-11	160	1.24	15736	12690	85.8	4.8
DE-S	53	0.66	18980	28758	34.3	10.8
G-100	8	0.63	30938	49108	8.4	18.4
S-200	12	0.22	19064	86654	7.8	32.5

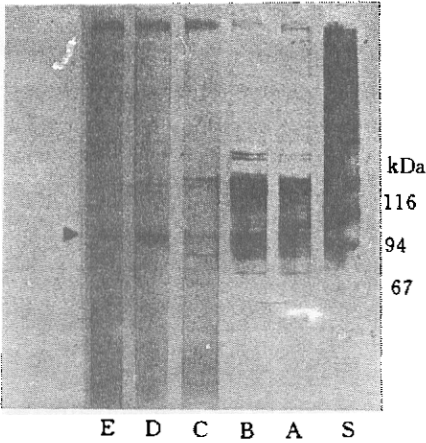


图 2 2-酮-L-古龙酸还原酶逐级纯化后聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig.2 Electrophoretic patterns on polyacrylamide gels of 2-Keto-L-gulonate reductase

- S. Standard molecular weight protein
- A. Cell free extract (CFE I)
- B. Sample after ultracentrifugation at 45 000g CFE II
- C. Fractions collected with KGR activity after DEAE-sephcal column
- D. Fractions collected with KGR activity after Sephadex G100 column
- E. Fractions collected with KGR activity after Sephacry S200 column

2.2.2 pH 对 KGR 活性的影响: 图 4 给出了 30℃ 厌氧环境下, KGR 酶促反应速度与溶液离子 pH 值的关系, 最适作用 pH 在 6.5 附近, 当 pH 小于 5.2 或大于 6.9 时, KGR 活性急剧下降。

2.2.3 温度对 KGR 酶活性的影响及稳定性研究: 通过逐渐升温在某一温度维持 30min 检测 KGR 酶活性方法。追踪了 15℃ 至 45℃ 温度范围内的酶活变化趋势。KGR 的最适作用温度为 30℃。(图 5) 若将 KGR 酶溶液在 40℃ 下保温 50min。再迅速冷却到 30℃, 其酶活尚能回复。若保温温度高于 40℃, 酶活迅速丧失, 即使温度降下来也不能回复。KGR 对高温十分敏感。(见表 2)。

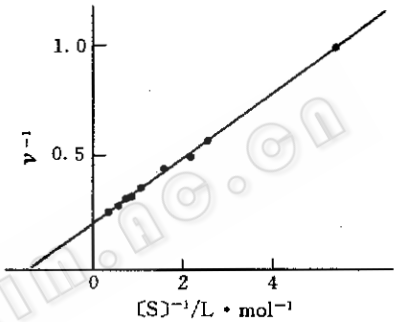


图 3 2-酮-L-古龙酸浓度对 KGR 活性的影响
Fig.3 Lineweaver-Burk plot for effect of 2-keto-L-gulonic acid concentration on KGR activity

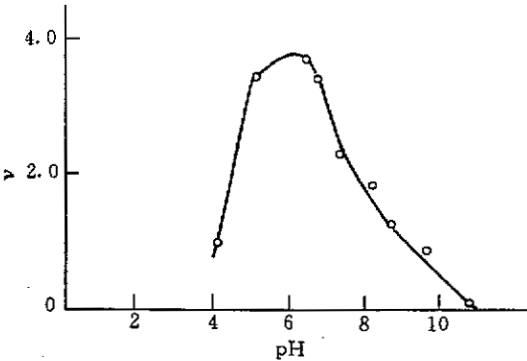


图 4 pH 对 KGR 活性的影响
Fig.1 Effect of pH on KGR activity

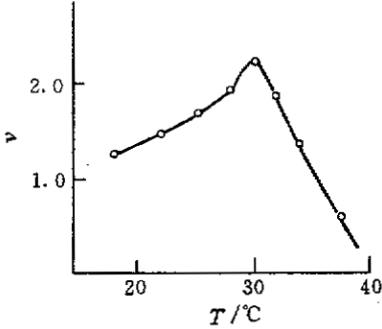


图 5 温度对 KGR 活性的影响
Fig.5 Effect of temperature on KGR activity

表 2 KGR 酶的温度稳定性

Table 2 Effect of temperature on KGR stability

T/℃	t/min							Recovery
	0	15	20	25	30	40	50	
35	2.13	2.15	-	2.19	2.30	2.14	-	2.15
40	2.13	1.42	1.42	-	0.91	0.75	0.63	0.18
43	2.13	0.35	0.16	-	0.05	0.00	-	0.00
45	2.13	0.00	0.00	0.00	-	0.00	-	0.00

2.3 KGR 在采用流加 L-山梨糖工艺发酵过程中的变化

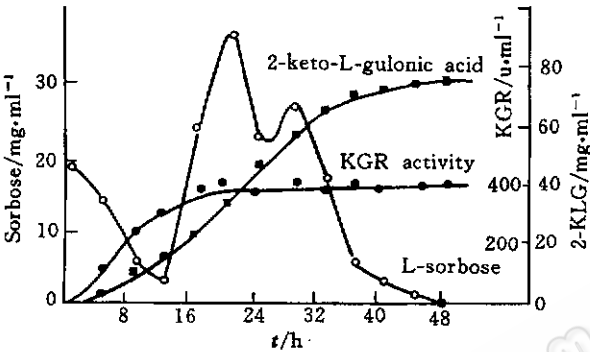


图 6 在 L-山梨糖发酵过程中 KGR 活性的变化

Fig. 6 Development of KGR activity during L-sorbose fermentation procedure

工业化二步发酵法生产维生素 C 过程中,采用流加 L-山梨糖工艺,以促进转化率的提高。为了解这一过程中 KGR 的变化规律,对 KGR 的酶活、比活性、L-山梨糖消耗和产物 2-酮-L-古龙酸的积累进行追踪。发酵液中 L-山梨糖含量的变化曲线代表底物消耗速率与流加底物速率之间的平衡。

由图 6, 7 所示得知, KGR 酶活变化与 L-山梨糖的浓度无关,但其酶活的增长却超前于发酵液中 2-酮-L-古龙酸的积累,这表明了

KGR 的合成不受 L-山梨糖和 2-酮-L-古龙酸的诱导。可推测 KGR 为混菌 *G. oxydans* 和 *B. megaterium* 的组成酶。

与此同时,又进行了混菌发酵平皿培养及单菌发酵摇床培养。平皿培养结果表明:发酵初期 *B. megaterium* 的生长占主导,在发酵进行到 12h 左右,前者的生长受到严重抑制,镜检可发现 *B. megaterium* 所占比例迅速下降, *G. oxydans* 的生长占了主导地位,进入对数生长期, *G. oxydans* 菌数迅速增加。然而由于不断流加,发酵体积随之增加,则单位体积内 *G. oxydans* 的菌数波动不大,而 KGR 总酶活的发展趋势也呈缓平台,故可认为 KGR 与 *G. oxydans* 的生长量有一定联系。由于目前单独培养 *G. oxydans* 还未获得成功,工业上采用 *G. oxydans* 与 *B. megaterium*, *Pseudomonas striata* 以及其它细菌混菌发酵的方法制备 2-酮-L-古龙酸,为证实 KGR 存在于

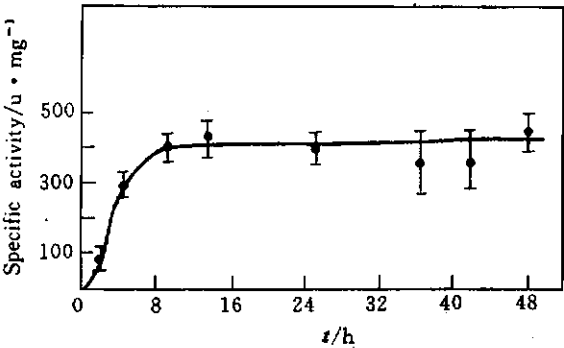


图 7 在 L-山梨糖发酵过程中 KGR 比活的变化

Fig. 7 Course of specific activity of KGR during L-sorbose fermentation procedure

表3 不同时间混菌与大菌中 KGR 酶活对照

Table 3 Comparison of KGR activity in mixed culture and monocultures of *B. megaterium* & *P. striata* with the different time

Specific activity $\mu\text{u}\cdot\text{mg}^{-1}$ Strain	t/h	8	16	24	32	40	48
<i>B. megaterium</i>		380	410	350	400	380	420
<i>P. striata</i>		0	0	0	0	0	0

混合菌的那一株中,本实验检测了单独培养的 *B. megaterium*, *P. striata* 的无细胞抽提液 KGR 酶的活性。由表 3 可知, *B. megaterium* 或 *P. striata* 单菌发酵无 KGR 酶活,故可认为 KGR 生长与该二菌株无直接关系。所以,根据上述实验现象,推测 KGR 可能为 *G. oxydans* 的一个胞内组成酶,更详细的研究有待进一步加深。

参 考 文 献

- [1] 宁文珠,尹光琳, European Patent, 0278447, 1988.
- [2] 尹光琳,马志方,董文珍,微生物学报, 1991, 31: 198~205.
- [3] Hoshino T, Kitamura I, Masuda S. Agric Biol Chem., 1990, 54: 1210~1218.
- [4] Sugisawa T, Shinjon M, Nomura S. Agric Biol Chem., 1990, 54: 1201~1209.
- [5] 张龙翔,张庭芳,李令媛,《生命实验方法和技术》,北京:高等教育出版社,1984.
- [6] 鲁子贤,许根俊,林其谁,《蛋白质和酶学研究方法》,北京:科学出版社,1989.

Study on the Purification of 2-Keto-L-gulonate Reductase and Its Physical, Chemical and Enzymic Properties

Jiang Yuyang Guo Zhenyong Zhang Chenggang
(Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110015)

Abstract 2-Keto-L-gulonate reductase has been purified from the cell free extract of the mixed culture of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in the fermentation of L-sorbose. Its MW is 90kDa. Dynamic studies demonstrates that it is a typical Michaelis-Menten enzyme with K_m of 3.42×10^{-3} mol for 2-keto-L-gulonic acid. Its optimal pH and temperature are 6.5 and 30°C respectively. The 2-keto-L-gulonate reductase is induced by neither L-sorbose nor 2-keto-L-gulonic acid, so that it is conjectured a constitutive enzyme of *gluconobacter oxydans*.

Key words L-ascorbic acid, L-sorbose, 2-keto-L-gulonic acid, 2-keto-gulonate reductase