

维生素 C 发酵中 2-酮-L-古龙酸还原酶的研究

蒋宇扬* 郭振勇 靳素英 蔺继尚 张成刚

(中科院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110015)

由于 2-酮-L-古龙酸还原酶(简称 KGR)的存在,理论上造成了 Vc 合成前体 2-酮-L-古龙酸(简称 2-KLG)部分被还原成 L-艾杜糖酸^[1,2],影响了 Vc 二步发酵的产率。而从 L-山梨糖到 2-酮-L-古龙酸的转化中,除被 KGR 催化的还原负反应外,均属于氧化反应。所以,从该角度出发,抑制 KGR 的活性,消除还原负反应,是提高 2-KLG 产酸率,进而提高 Vc 二步发酵产率的关键。本研究在纯化 KGR 的基础上^[3],对其物质组成及性质进行了研究,并研制了几种稀土元素化合物,考察了它们对 KGR 纯酶及在 L-山梨糖发酵中对 2-KLG 产酸率的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验菌株与 L-山梨糖发酵培养基:见文献[3]。

1.1.2 试剂药品:常规生化试剂均购于 Pharmacia、Sigma 公司;2-酮基-L-古龙酸(精品)由东北制药总厂提供;稀土元素化合物(纯度:99%以上)购于国营二〇二厂。

1.2 方 法

1.2.1 KGR 活性与 2-酮-L-古龙酸含量测定:见文献[3]。

1.2.2 KGR 蛋白亚基分析^[4,5]:SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.3 等电聚焦电泳:KGR 等电点的测定等参照文献[4,5]进行。

1.2.4 实验数据统计分析:文中摇瓶发酵数据均经过统计分析,以平均值(±)标准误差形式列出,涉及数据间的加减运算,标准误差以公式 $(SEA^2 + SEB^2)^{1/2}$ 计算;涉及数据间的乘除运算,标准误差以公式

$$A \cdot B[(SEA/A)^2 + (SEB/B)^2]^{1/2} \text{ 计算。}$$

2 实验结果

2.1 KGR 的物质组成及性质

2.1.1 KGR 的亚基组成:将 L-山梨糖发酵液,



图 1 2-酮-L-古龙酸还原酶 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

S; Standard molecular weight protein. 1. Sample after ultracentrifugation at 45 000g CFE II; 2. Fractions collected with KGR activity after DEAE-sephacal column; 3. Fractions collected with KGR activity after Sephadex G100 column; 4. Fractions collected with KGR activity after Sephacry S200 column.

本研究系国家“八、五”攻关项目。

* 联系人:清华大学化学系生命有机磷开放实验室,北京,100084。

收稿日期:1997-06-05,修回日期:1997-11-19。

经分子筛、离子交换四步的分离纯化,得到约 90kDa 的一条电泳纯 KGR^[3]带。将其进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,由图 1 得知 KGR 是由两个亚基组成的二聚体,分子量分别为 53kDa 与 32kDa,二者之和为 85kDa 接近 90kDa^[3],可能包含有糖类组分。

2.1.2 KGR 的氨基酸组成分析与等电点: KGR 的氨基酸分析结果见表 1。除色氨酸未测外, KGR 至少含有 17 种氨基酸,在已检测的氨基酸中,碱性氨基酸仅占 8.73%,酸性氨基酸的含量最高可达 22%。与等电聚焦电泳分析结果相符,其等电点 pI 为 3.60,酶蛋白显酸性。

2.2 稀土元素化合物对 KGR 活性的影响

在 KGR 与底物 2-KLG 的溶液中,分别加入各种浓度的稀土元素化合物后测定 KGR 活性。由表 2 可知,未加稀土元素的对照组,OD 值迅速下降,表明 KGR 对底物的作用。加入稀土元素化合物后,OD 值下降的速度减缓或几乎不变,表明了稀土化合物对 KGR 酶的抑制作用。在其浓度达到 0.5% 时, KGR 酶活性完全被抑制(KGR 纯品本实验室自制,见文献[3])。

表 1 KGR 的氨基酸组成

Amino acid	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Arg	Pro	Lys	Trp
Percentage/%	11.30	5.81	5.26	10.77	8.49	10.21	0.06	5.79	0.53	4.54	6.84	2.20	3.29	1.11	2.95	2.49	4.67	未测

表 2 稀土元素化合物对 KGR 活性的影响

	Changes of OD value after adding rare earth compounds*	ΔOD
Control	0.350, 0.344, 0.337, 0.333, 0.330, 0.326, 0.322, 0.318	0.032
RE-KGR(0.005%)	0.352, 0.342, 0.337, 0.334, 0.331, 0.328, 0.327, 0.326	0.026
RE-KGR(0.05%)	0.414, 0.414, 0.407, 0.404, 0.401, 0.398, 0.395, 0.393	0.021
RE-KGR(0.5%)	0.318, 0.319, 0.319, 0.319, 0.319, 0.319, 0.318, 0.318	0.000

* Record every 0.5min, RE-rare earth element.

2.3 稀土元素化合物对 L-山梨糖发酵时间的影响

先后对各种稀土金属化合物对纯 KGR 酶的抑制作用进行了筛选。利用选择到的几个配方对 L-山梨糖发酵的作用进行试验。首先考察了加入 KGR 抑制剂后对发酵时间的影响,结果表明在加入稀土化合物之后,发酵 42h 即可达到对照组 48h 时的 2-KLG 产酸水平(表 3),缩短发酵时间 6h。

表 3 稀土元素化合物对 L-山梨糖发酵时间的影响

Fermentation time/h	Acid yield/(mg·ml ⁻¹)				
	REAYJ-1	REAYJ-2	REAYJ-3	REAYJ-4	Control
24	37.6	36.81	33.68	33.68	31.33
42	68.65	64.43	63.43	64.22	
48	—	—	—	—	63.82

2.4 稀土元素化合物对 L-山梨糖转化率的影响

表 4 列出了 8 组稀土元素化合物 KGR 抑制剂对 L-山梨糖发酵转化率即 2-酮-L-古龙酸产率的影响,每一种添加剂配方,均做 3 个平行试验,取平均值,括号内数据为标准误差。其中 4 组 2-KLG 产酸量的提高超过 6mg/ml,与未加稀土元素化合物 KGR 抑制剂的对照实验相比,转化率提高 10% 以上,统计结果表明,增长数据显著。

表 4 稀土元素化合物对 2-酮-L-古龙酸产率的影响

No.	Abbr. of Rare-earth additive	2-KLG yield/(mg·ml ⁻¹)		Net increment / (mg·ml ⁻¹)	Increment percent / %
		Rare-earth additive	Control		
1	REAJL	57.70(1.97)	55.60(0.56)	2.10(2.05)	3.78(3.68)
2	REACZ	66.82(2.02)	63.43(1.04)	2.77(2.27)	5.345(2.93)
3	REAYY	62.32(0.90)	58.74(1.00)	3.58(1.38)	6.09(2.35)
4	REAYJ	68.12(2.73)	63.18(1.44)	4.94(3.09)	7.82(4.89)
5	REAGZ	66.83(2.39)	59.40(1.76)	7.43(2.97)	12.51(3.14)
6	REajs	66.56(1.36)	59.82(1.14)	6.74(1.77)	11.31(2.86)
7	REACG	72.05(1.71)	63.33(1.82)	8.72(2.50)	13.77(3.97)
8	REAJJ	68.91(1.11)	61.98(1.41)	6.93(1.79)	11.18(2.75)

3 讨论

稀土元素化合物对 KGR 酶活性有抑制作用。在 L-山梨糖的发酵中,有缩短发酵时间和提高发酵产率的特性。在机理探讨上,我们初步认为,因 KGR 催化 2-KLG 转化 L-艾杜糖酸的负反应为一还原反应。从化学角度上分析,KGR 为电子供体亲核试剂,在其作用下,2-KLG 的酮羰基的双键打开被还原成醇羟基,形成了 L-艾杜糖酸。而稀土元素外层与次外电子层有多个空轨道,极易与极性氨基酸中有强供电性基团络合。所以在 L-山梨糖发酵过程中加入稀土元素化合物,目的是希望它与 KGR 的催化供电基团配合,形成稳定的络合物。封闭 KGR 的催化活性中心,从而抑制 KGR 的酶活,消除生成 L-艾杜糖酸负反应,提高 L-山梨糖转化 2-KLG 的产率。但由于 L-山梨糖转化 2-KLG 的发酵体系十分复杂,所以上述机理探讨仅为一种可能,有待于进一步的验证与完善。而本研究工作在东北制药总厂 Vc 车间菌种组现场摇瓶试验结果已表明,在 L-山梨糖发酵中加入稀土元素化合物,可抑制 KGR 的酶活,提高 2-KLG 的产酸率及缩短发酵时间。

参 考 文 献

- 1 Hoshino T, Sugisawa T, Tazoe M *et al.* *Agric Biol Chem*, 1990, **54**:1210~1218
- 2 Sugisawa T, Hoshino T, Masuda S. *Agric Biol Chem*, 1990, **54**:1201~1209
- 3 蒋宇扬,郭振勇,张成刚. *生物工程学报*, 1997, **13**(4):400~405
- 4 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
- 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

Study on 2-keto-L-gulonate Reductase in Vitamin C Fermentation

Jiang Yuyang Guo Zhenyong Jin Suying Lin Jishang Zhang Chenggang

(Institute of Applied Ecology, The Chinese Academy of Science, Shenyang 110015)

Abstract 2-keto-L-gulonate reductase is composed of two Subunits, one with MW 32kDa, the other with 53kDa. Its isoelectric point is pI 3.6. The content of acidic amino acid is 22% of total protein. It is found that the rare earth metal compounds have a suppressive effect of on the activity of 2-keto-L-gulonate reductase. Using such rare earth metal compounds in the two steps fermentation of Vc, the fermentation time is shortened by 6 hours and the product of 2-keto-L-gulonic acid is increased by 10% more.

Key words 2-keto-L-gulonate reductase, depressant, rare-earth metal compound