

重组 1,3-丙二醇氧化还原酶酶学性质和稳定性的研究*

罗菊香¹, 方柏山²

1(三明学院化学与生物工程系, 福建 三明, 365004)

2(华侨大学福建省高等学校工业生物技术重点实验室, 福建 泉州, 362021)

摘 要 1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR)是以甘油为底物生产 1,3-PD 途径中的关键酶之一。将 *dhaT* 在 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 进行了表达,对含有 6×His 标记的 PDOR 进行了纯化,同时考察了重组 PDOR 的酶学性质和稳定性。重组 PDOR 反应的最适 pH 和温度分别是 10.0 和 55°C;在 pH 7.0~8.0,酶保持了较高的稳定性,酶在 30°C 保温表现出较高的稳定性;Ca²⁺,Mg²⁺ 和 Cu²⁺ 对酶活性有抑制作用,而 Fe²⁺, Na⁺, NH₄⁺ 和 Mn²⁺ 对酶活有促进作用;冷冻干燥处理后,PDOR 酶活有一定的损失;添加适当浓度的保护剂——海藻糖、葡萄糖、蔗糖、聚乙二醇,对酶在冷冻干燥时有保护作用;添加 5% 蔗糖的固体酶制剂在保存过程中表现出较好的稳定性。

关键词 1,3-丙二醇氧化还原酶,纯化,酶学性质,冷冻干燥,稳定性

1,3-丙二醇(1,3-PD)作为聚酯材料的单体,在地毯和纺织材料领域应用前景非常广泛^[1]。每年通过化学法合成的 1,3-PD 多达 10 万 t^[2]。然而化学法的生产工艺复杂,成本较高,产率低。对环境友好的生物转换法逐渐成为国内外研究的热点。现已发现,梭状芽孢杆菌属(*Citrobacter freundii*)、克氏肺炎杆菌属(*Klebsiella pneumoniae*)和柠檬菌属(*Clostridium pasteurianum*)等细菌在厌氧条件下,可以以甘油为唯一碳源和能源物质发酵生产 1,3-PD^[3,4]。其中克氏肺炎杆菌具有较高的生产强度和甘油耐受力,是研究得比较多的一种菌^[5]。在厌氧条件下,甘油的生物转化主要由 2 种酶进行调控:甘油脱水酶(GDHt, EC 4.2.1.30)和 1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR, EC 1.1.1.202)。在还原途径中,甘油在 V_{B12} 为辅酶的 GDHt 的作用下,生成三羟基丙醛(3-HPA),然后再以 NADH+H⁺ 为辅酶的 PDOR 的作用下,生成目的产物 1,3-PD。1,3-PD 不再进一步代谢,分泌到胞外^[6]。

然而发酵过程中产生的一系列副产物会严重影响 1,3-PD 浓度的提高^[7]。有研究者致力于提高 1,3-PD 产率和提高其在发酵液中的终浓度的研究^[8],但是 1,3-PD 的理论最高得率为 72%,限制了微生

物发酵法的进一步发展^[7]。因此通过传统的细胞发酵的方法解决该问题的可能性不大,解决的可行途径是使用纯化的酶^[2]。陈宏文^[9]已经开展了采用酶偶联法体外催化生产 1,3-PD 的研究,也就是利用 GDH 将甘油还原成二羟基丙酮(DHA)所产生的辅酶 NADH,解决 PDOR 将 3-HPA 氧化成 1,3-PD 所需的辅酶再生问题,同时生产 DHA^[10](一种重要的化学合成中间体、多功能试剂、医药中间体、和抗病毒,特别是鸡瘟病毒试剂)。

PDPR 是生产 1,3-PD 的关键酶之一,目前仍然没有实现商品化^[11]。本文对重组 PDPR 的酶学性质和稳定性进行研究,为辅酶再生的酶偶联法催化生产 1,3-PD 奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、试剂及仪器

基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)pLysS(pET-15b-*dhaT*),由工业生物技术福建省高等学校重点实验室(华侨大学)保存;辅酶 NAD,AMRESCO 公司;氨苄青霉素,BBI 公司;聚乙二醇 8000,Amrcsco;其它试剂为国产分析纯或生物试剂。

ÅKTA purifier 10/100 纯化系统,Amersham 公司;EYEL4-FDU-2100 型冻干机,东京理化器械株式会社;紫外可见分光光度计(WFZ756),上海光谱仪器公司;超声细胞破碎仪(JY92-II),宁波新芝仪器厂;高度冷冻离心机 3K30,Thermo 公司。

1.2 方 法

第一作者:硕士研究生(方柏山教授为通讯作者)。

*“863 计划”项目(2006AA020103),国家自然科学基金资助项目(20676048),福建省科技计划项目基金(2003J020)资助。

收稿日期:2008-04-02,改回日期:2008-07-11

1.2.1 培养基及菌种培养条件

种子培养基:LB 培养基,氨苄青霉素 75μg/mL, pH 7.5,37℃,培养过夜;发酵培养基同种子培养基, 30℃ 培养至对数生长期,加入乳糖诱导,诱导温度为 25℃。

1.2.2 重组 PDOR 的纯化

发酵结束后,离心收集菌体,20 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液和 2 mmol/L 二硫苏糖醇重悬菌体,超声波破碎后,收集上清酶液。由于 PDOR 带有 6×His 标记,用 Amersham 公司的 ÄKTA purifier 10/100 纯化系统和 HisTrap HP 柱对 PDOR 进行纯化。样品上柱后用 5 个柱体积的结合缓冲液洗涤,再用 5 个柱体积的洗脱液进行洗脱(20 mmol/L 磷酸钠,0.5 mol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑,pH 7.4)。使用 HiPrep 26/10 Desalting 柱对洗脱液进行脱盐(50 mmol/L 磷酸钠,0.15 mol/L NaCl,pH 7.0)。

1.2.3 PDOR 酶活测定方法

采用初速度法测定 PDOR 的酶活力,测定方法见文献^[9]。

1.2.4 重组 PDOR 酶学性质的研究

1.2.4.1 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性的测定

最适 pH 值的测定:在 45℃、0.1 mol/L 的 1,3-PD、2 mmol/L 的 NAD⁺、不同的 pH 值条件下,分别测定酶活,以酶活最高为 100%,计算相对酶活。所用缓冲液是 pH7.0~8.0 的 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液,pH 9.0~12.0 的 0.1mol/L 碳酸钾缓冲液。

pH 值稳定性的测定:将酶液置于不同 pH 值的缓冲液中,在 45℃ 保温 120 min,再分别测定残留酶活性,与不保温酶的酶活相比,计算百分比。缓冲液的选择同上。

1.2.4.2 最适反应温度和热稳定性的测定

最适反应温度的测定:在 30~65℃,以及 0.1mol/L 的 1,3-PD、2 mmol/L 的 NAD⁺、pH 值

9.5 的条件下,每隔 5℃,分别测定酶活。以酶活最高为 100%,计算相对酶活。

热稳定性的测定:在 pH 值 9.5 的碳酸钾缓冲液中,分别将酶液置于 30℃、45℃ 下保温 30、100、240min,再测定相对酶活,以 4℃ 保存的酶样活性为 100%,测定酶的热稳定性。

1.2.4.3 金属离子对酶活力的影响

将酶液置于不同 10 mmol/L 一价、二价离子的反应液中,过夜放置。反应液中还含有 0.1 mol/L 的 1,3-PD、2 mmol/L 的 NAD⁺ 和 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0),以不添加离子的酶样活性为 100%,考察金属离子对酶活力的影响。

1.2.5 冷冻干燥

样品在-20℃冰箱中预冻 2h,抽真空,冷冻干燥 12h。

1.2.6 保护剂对 PDOR 冷冻干燥的影响

在酶液中分别加入 0.1%、1%、5%、8% 的海藻糖、葡萄糖、蔗糖、聚乙二醇,待冻干结束后,用 50mmol/L 磷酸钠缓冲液复溶,测定酶活,计算剩余酶活。

$$\text{剩余酶活}/\% = \frac{\text{冷冻干燥后样品酶活}}{\text{冷冻干燥前样品酶活}} \times 100$$

1.2.7 固体酶制剂在保存过程中酶活保持率的测定
不加保护剂、加 5% 蔗糖的固体酶制剂密封放置于 4℃ 冰箱,分别于 1、2、3 个月后测定酶活。计算酶活保持率。

$$\text{酶活保持率}/\% = \frac{\text{处理后的酶活}}{\text{处理前的酶活}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 重组 PDOR 的纯化

选择 Histrap HP 柱对带有 6×His 标记的重组 PDOR 进行纯化,结果如表 1。

表 1 重组 PDOR 的纯化

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力/U	比活力/U·mg ⁻¹	纯化倍数	收率/%
粗酶液	37.2	2 976	80.0	1	100
纯化酶液	7.68	1 488	194	2.42	50.0

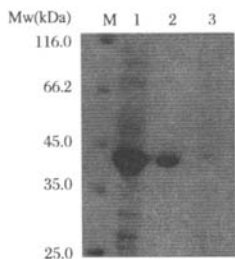
从表 1 可以看到纯化后酶的回收率是 50.0%,纯化倍数是 2.42 倍,纯化后酶的比活力高达 194 U/mg。同时进行了 SDS-PAGE 电泳来检验得到的蛋白的纯度,结果如图 1。

从泳道 1 可以看到样品中目的蛋白含量较高,而泳道 3 对应的目的蛋白几乎没有,因而目的蛋白基本

上都与 HisTrap HP 柱上的镍结合了,从泳道 2 可以看到,除了目标蛋白,没有其它条带,得到了电泳纯的目的蛋白。

2.2 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性

经纯化的重组 PDOR 在不同 pH 值(7.0~12.0)下进行酶促反应以测定其最适 pH 值,结果见



M—标准分子量蛋白；1—粗酶液；2—洗脱的目标蛋白；3—样品过柱之后的穿透蛋白

图1 PDOR 纯化电泳图

图2。从图可以看出,纯化的PDOR酶活随着反应液pH值的变化而变化,在pH值为10.0时,PDOR的酶活最大。在pH 7.0~12.0,考察了PDOR的pH值稳定性,见图3。结果表明,在pH 7.0~8.0,酶保持了较高的稳定性,pH值继续增加酶活力损失严重,在pH 11.0和12.0已经检测不到酶活。

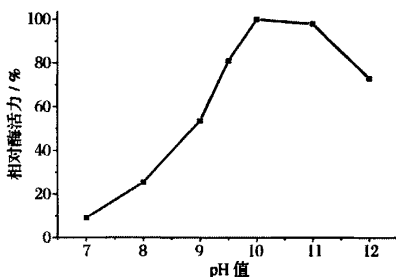


图2 反应pH对重组PDOR活性的影响

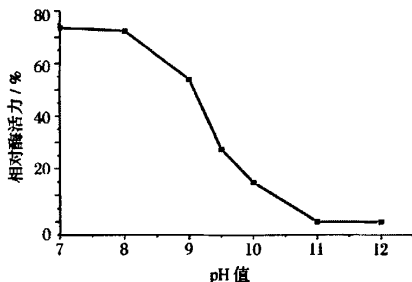


图3 pH对重组PDOR稳定性的影响

2.3 最适反应温度和热稳定性

最适温度的测定是在pH值9.5、0.1mol/L的碳酸钾缓冲体系下进行的酶促反应,结果如图4。重组PDOR酶活力随温度升高逐渐增加,约55℃时,PDOR活力最大;当温度超过60℃时酶活力下降。分别在30℃、45℃考察了重组PDOR的热稳定性,结果见图5。PDOR在30℃、45℃保温4h后酶相对活力分别为87.5%,69.6%。可见在PDOR在30℃

具有较好的热稳定性。

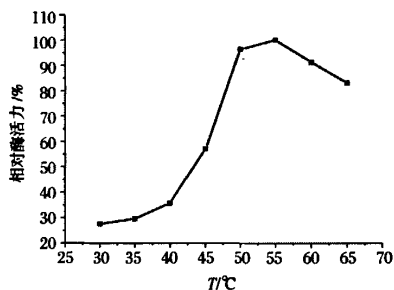


图4 反应温度对重组PDOR活性的影响

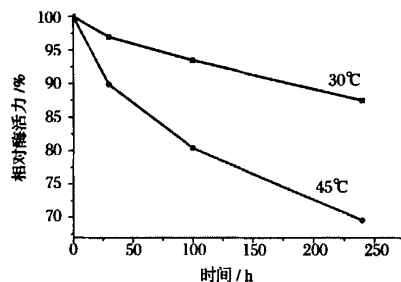


图5 温度对重组PDOR稳定性的影响

2.4 金属离子对酶活力的影响

为确定金属离子对酶活力的影响,在含有不同10 mmol/L一价、二价金属离子的反应液中,考察金属离子对酶活力的影响。以不添加金属离子为对照(100%),结果如表2。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活力均有明显的抑制作用, Cu^{2+} 使酶的活性丧失,而 Fe^{2+} 、 Na^{+} 、 NH_4^{+} 和 Mn^{2+} 对酶的活性均有一定的促进作用。

表2 金属离子对重组PDOR活力的影响

离子	相对酶活力/%
对照	100
Fe^{2+}	112
Mn^{2+}	128
Li^{+}	100
Ca^{2+}	24
Mg^{2+}	72
Na^{+}	112
NH_4^{+}	120
Cu^{2+}	0

2.5 粗酶液和纯化酶液的稳定性

将粗酶液和纯化酶液放置于4℃冰箱,考察酶液的稳定性,结果如图6和图7。从图6中可以看出,粗酶液失活很快,4h之后酶活保持率只有45.5%。从图7中可以看出,纯化酶液的稳定性较粗酶液明显增强,30d后酶活保持率有51.2%,但是60d后,几乎检测不到酶活。

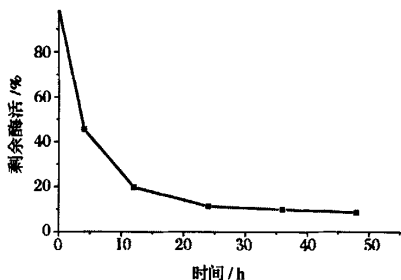


图6 粗酶液在4°C的稳定性

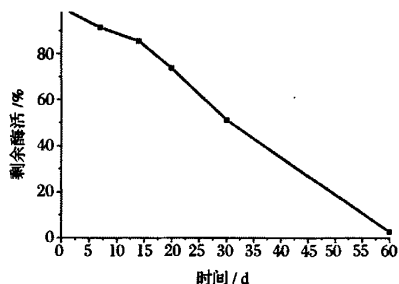


图7 纯化酶液在4°C的稳定性

2.6 冷冻干燥过程 PDOR 酶活的损失

冷冻干燥是一个多步骤的过程,会产生很多种应力使蛋白质变性,如低温应力、冻结应力和干燥应力。从图8中可以看出,酶液经过冻干处理后,酶活有一定的损失。所以为了提高酶液在冷冻干燥时的稳定性,可以加入适合的保护剂与酶复合。

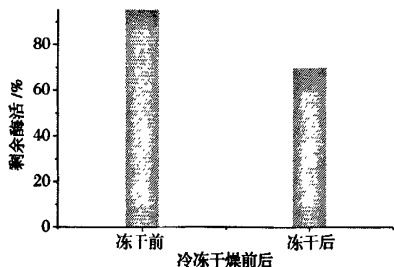


图8 冷冻干燥前后纯酶酶活

2.7 保护剂对冷冻干燥过程 PDOR 酶活的保护作用

从图9看出,3种糖类在PDOR冷冻干燥过程都有保护作用。添加海藻糖和葡萄糖时,随着浓度的增加,保护作用均增强,但是相应浓度下海藻糖的保护效果优于葡萄糖。添加5%蔗糖,保护效果与海藻糖浓度为5%时的保护效果相当(酶活残留率达99.8%)。随着蔗糖浓度增加,由于糖浓度过高而造成高渗透压,酶分子在水中的溶解度下降,冻干时的保护作用下降。蔗糖较海藻糖价格低廉,因此在酶液

冻干时选择蔗糖为保护剂。

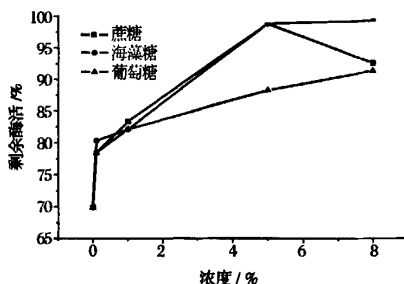


图9 糖类对PDOR冻干时酶活残留率的影响

聚乙二醇是一种多羟基化合物,在冷冻干燥过程中,这类物质会与蛋白质表面形成氢键,代替水的存在,使蛋白质在缺水条件下仍能保持稳定的结构从而减少活性的损失^[12]。如图10所示,添加聚乙二醇可以对冻干过程中的酶起到保护作用,随浓度的增加,这种保护作用有所增强,但是聚乙二醇浓度超过5%时,酶活损失增加。而且聚乙二醇在PDOR冻干过程中的保护效果不如糖类。

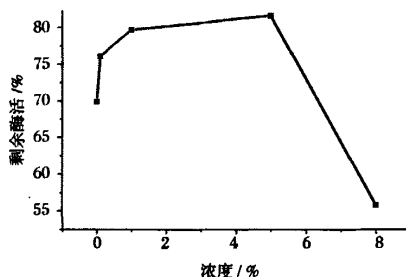


图10 聚乙二醇对PDOR冻干时酶活残留率的影响

2.8 固体酶制剂在保存过程中酶活保持率的测定

添加保护剂不仅可以降低冻干时的酶活损失,还对酶制剂的保存有重要意义。将冻干的酶制剂密封放置于4°C冰箱。未添加保护剂的酶制剂放置1个月酶活保持率为47.2%,2个月后就检测不到酶活。添加了蔗糖的酶制剂分别于1、2、3个月测定酶活(如表3所示),酶活保持率分别为96.8%、82.6%、76.1%,添加了保护剂的固体酶制剂稳定性明显增强。

表3 固体酶制剂的保存稳定性

时间/月	固体酶制剂酶活保持率/%	
	不加保护剂	加5%蔗糖
1	47.2	96.8
2	—	82.6
3	—	76.1

3 讨 论

选择 HisTrap HP 柱对重组 PDOR 进行纯化,纯化后,酶的回收率是 78.5%,纯化倍数是 2.74 倍。

酶的最适 pH 值和温度分别是 10.0 和 55°C;在 pH7.0~8.0,酶保持了较高的稳定性;酶在 30°C 保温表现出较高的稳定性; Fe^{2+} 、 Na^+ 、 NH_4^+ 和 Mn^{2+} 对酶的活性有促进作用, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶的活性有抑制作用。

破壁粗酶液中 PDOR 的稳定性较差,在 4°C 冰箱中保存 4h 后酶活剩余率只有 45.5%;纯化的酶液稳定性明显增强,在 4°C 冰箱中保存 30 天后酶活剩余率为 51.2%。冷冻干燥处理后,PDOR 酶活有一定的损失。添加适当浓度的保护剂海藻糖、葡萄糖、蔗糖、聚乙二醇,对酶在冷冻干燥时有保护作用。海藻糖、蔗糖的保护效果明显优于葡萄糖、聚乙二醇。添加 5% 的海藻糖或者蔗糖,可以保护酶液在冷冻干燥过程中不失活,由于蔗糖价格低廉,因此可以选择添加蔗糖作为 PDOR 冻干时的保护剂。实验还表明,冷冻干燥过程添加了 5% 蔗糖的固体酶制剂在保存过程中表现出较好的稳定性。

参 考 文 献

1 Witt U, Muller R J, Augusta J, et al. Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol[J]. Makromol Chem Phys, 1994, 195:793~802

2 Nemeth A, Kupcsulik B, Sevelia B. 1, 3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2003, 19: 659~663

3 Homann T, Tag C, Biebl H, et al. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33: 121~126

4 Dabrock B, Bahl H, Gottschalk G. Parameters effecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58:1 233~1 239

5 Deckwer WD. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol[J]. FEMS Microbiol Rev, 1995, 16:143~149

6 Toraya T, Kuno S, Fukui S. Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*[J]. J Bacteriol, 1980, 141:1 439~1 442

7 Biebl H, Menzel K, Zeng AP, et al. Microbial production of 1,3-propanediol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 289~297

8 Biebl H, Marten S. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol: use of cosubstrates[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44: 15~19

9 陈宏文. 生物法合成 1,3-丙二醇的过程工程研究[D]. 天津大学博士学位文, 2005

10 郑裕国,张震,沈寅初. 微生物转化甘油生产 1,3-二羟基丙酮的菌株筛选[J]. 浙江工业大学学报, 2001, 29: 124~127

11 Skraly F A, Lytle B L, Cameron D C. Construction and Characterization of a 1,3-Propanediol Operon[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 98~105

12 Abadias M, Benabarre A, Teixido N, et al. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 65: 173~182

Study on the Characteristics and the Stability of Recombinant 1,3-propanediol Oxidoreductase

Luo Juxiang¹, Fang Baishan²

1(Department of Chemistry and Biology Engineering, Sanming University, Sanming 365004, China;

2(The Key Laboratory for Industrial Biotechnology of Fujian Higher Education,

Hua Qiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: 1,3-Propanediol oxidoreductase(PDOR) is the key enzyme in converting glycerol to 1,3-propanediol. In this paper, a recombinant PDOR had been over-expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. The 6×His-tagged PDOR could be purified by Histrap HP and gel-filtration chromatography. Then the characteristics and stability of recombinant PDOR were investigated. The results showed that the optimal pH and temperature for purified enzyme were 10.0 and 55 °C, respectively. PDOR was stable between pH 7.0~8.0, and stable at 30°C. The enzyme could be inhibited by metal ions including Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} , while increased by Fe^{2+} , Na^+ , NH_4^+ and Mn^{2+} . The activity of PDOR was lost partly after the freeze dried. During the freeze dried, trehalose, glucose, sucrose or polyethylene increased the stability of PDOR. The enzyme preparation which contained 5% sucrose showed good stability during preservation.

Key words 1, 3-propanediol oxidoreductase, purification, characterisation, freeze dried, stability