

生物电化学法转化甘油生产 1,3-二羟基丙酮

张雨薇^{1,2}, 杨雪鹏², 魏东芝², 艾志录^{*1}

(1. 河南农业大学 食品科学技术学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 氧化葡萄糖酸杆菌中依赖辅基吡咯喹啉醌(Pyrroloquinoline Quinone, PQQ)的膜结合甘油脱氢酶(Glycerol dehydrogenase, GDH)是酶法转化甘油生成 1,3-二羟基丙酮(1,3-Dihydroxyacetone, DHA)的关键酶。以铁氰化钾为电子媒介体,采用生物电化学法,再生甘油脱氢酶的辅基 PQQ,从而实现酶法循环转化甘油生产 DHA。设计电耦联反应装置,在 $(28\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 370 mV 电压下反应 18 h, DHA 质量浓度达到 27.21 g/L,甘油转化率为 52.93%。

关键词: 1-3 二羟基丙酮; 甘油脱氢酶; 生物电化学法; 氧化葡萄糖酸杆菌

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)03-0266-05

Bio-Electrochemical Synthesis of 1, 3-Dihydroxyacetone from Glycerol

ZHANG Yu-wei^{1,2}, YANG Xue-peng², WEI Dong-zhi², AI Zhi-lu^{*1}

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The membrane-bound glycerol dehydrogenase (GDH) was the key enzyme of bioconversion of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. The membrane fraction of *Gluconobacter oxydans* was collected by ultra-centrifugation, and GDH was isolated from the membrane fraction and purified by CM-cellulose column and Sephacryl HR 400 column chromatography. The electrochemical regeneration of the membrane-bound glycerol dehydrogenase was studied by cyclic voltammetry. Using this system, the bio-electrochemical preparation of 1, 3-dihydroxyacetone (DHA) from glycerol without coenzyme was investigated. When the temperature was $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, during 18 h, the DHA production reached at 27.21g/L and the conversion rate of glycerol was 52.93%.

Key words: 1,3-dihydroxyacetone, glycerol dehydrogenase, bio-electrochemistry, *Gluconobacter oxydans*

二羟基丙酮或 1,3-二羟基丙酮, 英文名为 1,3-dihydroxyacetone 或 dihydroxyactone, 简称为 DHA^[1], 是一种重要的医药中间体和功能添加剂, 在国外已得到广泛应用。作为生产 DHA 的原料——甘油随着近年来生物柴油的迅速发展而大

量产生。因此,生物法转化甘油生产 DHA 的研究对于延伸石化产品生产链,创造更好的经济和社会效益,提升行业竞争力具有积极作用。

生物法生产 DHA 可以分为微生物法和酶法两种。其中酶法生产过程中需要大量辅酶,而辅酶价

收稿日期: 2011-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976053); 郑州轻工业学院博士科研基金项目。

* 通信作者: 艾志录(1965—),男,河南辉县人,工学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事农产品精深加工方面的研究。

E-mail: zhila@163.com

格昂贵,因此在酶法生产中有必要对辅酶进行循环再生。目前,报道的辅酶再生的方法主要集中在双酶耦联反应^[2-3]。

作者针对氧化葡萄糖杆菌膜结合甘油脱氢酶(GDH)(EC1.1.99.22)^[4],设计生物电化学法再生甘油脱氢酶辅基 PQQ,从而实现甘油到二羟基丙酮的持续转化,进而提高产品得率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*):作者所在实验室保存。

1.1.2 培养基 斜面培养基:8 g/dL 山梨醇,2 g/dL 酵母粉,1 g/dL 氯化钠,2 g/dL 琼脂,自然 pH。

种子培养、基础发酵培养基:8 g/dL 山梨醇,2 g/dL 酵母粉,1 g/dL 氯化钠,自然 pH。

1.1.3 主要试剂 二羟丙酮显色液:二苯胺 4.8 g,浓硫酸 48 mL,冰醋酸 432 mL,混匀,避光保藏;吩嗪硫酸甲酯(PMS)、2,6-二氯酚吲哚酚钠(DCIP):美国 Sigma 公司;酵母粉:Oxoid 公司;D-山梨醇:北京 Solarbio 公司;甘油、铁氰化钾等试剂均为分析纯。

1.1.4 主要仪器 UV2300 紫外可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司;HZQ-F160 全温振荡培养箱:上海福玛实验设备有限公司;Cs350 电化学工作站:武汉科思特仪器有限公司;DS65A 高速冷冻离心机:美国 Beckman 公司;ZF-3 恒电位仪:上海正方电子电器有限公司;甘油含量测定试剂盒:北京五洲原业科贸公司。

1.2 方法

1.2.1 氧化葡萄糖杆菌的培养 将保藏斜面菌种转接斜面培养温度 28 °C,培养周期 2~3 d。挑取一环斜面菌种,接种于装有 50 mL 种子培养基的 150 mL 摇瓶中,28 °C、200 r/min 摇床培养 24 h。

按体积分数 10%接种量将种子培养液接入 1 L 发酵培养基中,200 r/min、28 °C 培养至对数后期(约 36 h)。

1.2.2 细胞膜组分的制备 离心收集菌体,收集的菌体用蒸馏水洗涤两次后重悬于 50 mmol/L 醋酸钠(pH 5.0)缓冲液中,通过匀浆机破碎细胞,利

用超速离心机 100 000 g 离心 60 min,上清液为细胞质组分,沉淀为细胞膜组分,用相同的缓冲液悬浮^[5-6]。

1.2.3 膜结合甘油脱氢酶的制备 将膜组分重新重悬于含体积分数 1% Triton X-100 的 40 mmol/L、pH 5.0 的醋酸钠缓冲液中,于 4 °C 缓慢搅伴 60 min。1 000 r/min 离心 30 min 去沉淀,上清液作为待纯化的样品。

经过 CM-Cellulose(1×10)柱和 Sephacryl HR 400 (1×120) 凝胶层析柱得到分离纯化的氧化葡萄糖杆菌膜结合甘油脱氢酶^[7-8]。

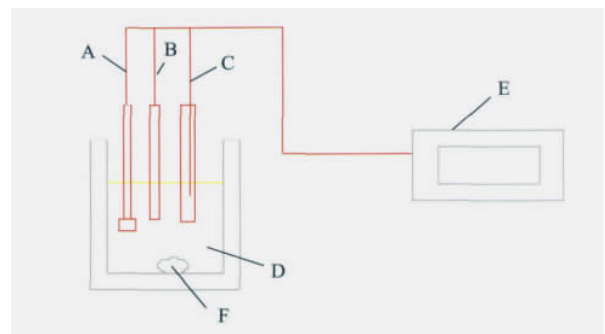
1.2.4 甘油脱氢酶活性测定 以 PMS 为电子受体,在催化反应过程中检测 600 nm 吸收值的变化。酶活力测定的反应体系组成为:0.325 mmol/L PMS 0.45 mL、0.25 mmol/L DCIP 0.45 mL、100 mmol/L pH 6.0 磷酸缓冲液 3 mL 和水 4.5 mL,即配即用。首先向比色皿里加入基本反应液 0.4 mL、200 mmol/L 甘油 0.1 mL 置于 1 cm 的比色皿中,30 °C 预热 5 min,600 nm 下吸收值平衡,然后加入酶液 10 μL 立即进行时间扫描。在 pH 6.0 下 DCIP 的消光系数为 10.8 L/mmol,一个酶活力单位(U)定义为 1 分钟还原 1 μmol 的 DCIP 的酶量。

1.2.5 蛋白质质量浓度的测定 采用 Lowry 法^[9]测定蛋白质质量浓度,以牛血清白蛋白作为标准品。称取牛血清白蛋白 10 mg,用 0.15 mol/L NaCl 溶液溶解,并定容至 10 mL,最终质量浓度为 1 mg/mL。

1.2.6 线性循环伏安曲线 线性循环伏安曲线的测定在 Cs350 电化学分析系统上进行,铂盘电极为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极。所有实验均在(28±2) °C、含 0.5 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 、0.1 mol/L KNO_3 、60 g/L 甘油的电解液中进行。扫描速率为 16 mV/s,扫描范围为-200~+500 mV。

1.2.7 生物电化学耦联反应 生物电化学反应的装置见图 1。铂盘电极为工作电极,铂电极为对电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,向反应容器中加入 55 mL 反应液,加入 5 mL(约 5 U)纯化后的甘油脱氢酶酶液通电后反应开始,电压为 370 mV,反应 18 h。所有反应均在(28±2) °C 进行。每隔 2

h 取 1 mL 反应液,测定反应液中甘油和二羟丙酮的含量。



A. 工作电极;B. 铂电极;C. 饱和甘汞电极; D. 100 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液,10 mmol/L 铁氰化钾,60 g/L 甘油;E:恒电位仪;F:搅拌器

图 1 生物电化学反应装置示意图

Fig. 1 Experimental setup of bio-electrochemical preparation of 1, 3-Dihydroxyacetone using GDH

1. 2. 8 DHA 定量分析方法 将反应液离心(5 000 r/min,10 min),取 0. 5 mL 上清液稀释至 5 mL,取

0. 5 mL 十倍稀释液与 4. 5 mL 显色液在试管中混匀,置于沸水浴中反应 15 min,流动水冷却 15 min 后于分光光度计测量 620 nm 处的吸光值。这一方法可在甘油存在下,定量检测出发酵液中质量浓度为 0~3. 5 mg/mL 的 DHA^[10]。

1. 2. 9 甘油定量分析方法 使用甘油含量测定试剂盒(北京五洲原业科贸公司)测定反应液中甘油残余量。

2 结果与分析

2. 1 膜结合甘油脱氢酶的制备

氧化葡萄糖酸杆菌膜结合甘油脱氢酶的制备主要经过 3 个步骤:1) 细胞膜组分的分离;2) 表面活性剂溶解膜蛋白;3) CM- 纤维素柱和 Sephacryl HR 400 (1×120) 凝胶柱层析。氧化葡萄糖酸杆菌中膜结合甘油脱氢酶的蛋白质分离纯化过程见表 1。

表 1 膜结合蛋白的纯化总表

Tab. 1 Purification of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *G. oxydans*

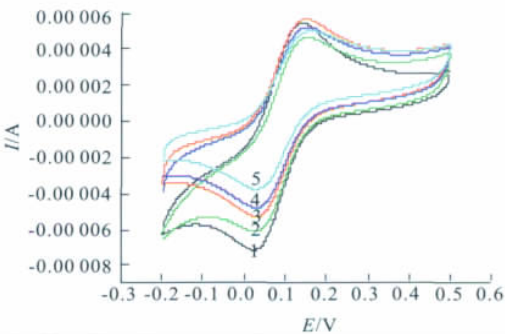
纯化步骤	总酶活力/U	总蛋白质质量/mg	酶比活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
膜蛋白	2016	1588	1. 27	100	1
表面活性剂溶解膜蛋白	1360	108	12. 6	67	9. 92
CM-纤维素层析	1172	31	37. 8	58	29. 76
Sephacryl HR400 层析	589	9. 4	62. 65	28. 9	49. 34

氧化葡萄糖酸杆菌中存在着两种形式的甘油脱氢酶,其中膜结合脱氢酶(EC1. 1. 99. 22)代谢途径是不需要 ATP 和辅酶因子 NAD⁺,甘油可被细胞膜上的甘油脱氢酶一步直接氧化成 DHA,这一过程的电子传递链由泛醌、细胞色素 O 和细胞色素 O 还原性酶组成^[11]。因此通过分离纯化的膜结合甘油脱氢酶无法连续利用甘油催化生成 DHA。

2. 2 循环伏安曲线

分别向含有 0. 5 mmol/L K₃[Fe(CN)₆],0. 1 mol/L KNO₃,60 g/L 甘油的电解液中添加 2、4、6、8 U 的甘油脱氢酶,得到的循环伏安曲线见图 2。随着甘油脱氢酶浓度的增加,还原电流响应降低。

随着甘油脱氢酶的加入,一部分[Fe(CN)₆]³⁻与 PQQH₂ 反应,见图 3。电极表面的[Fe(CN)₆]³⁻浓度降低,还原电流相应降低。反应方程式为:



1~5 分别表示甘油脱氢酶(GDH)含量:0 U,2 U,4 U,6 U,8 U

图 2 不同 GDH 浓度下铁氰化钾循环伏安曲线

Fig. 2 Cyclic Voltammogram of K₃[Fe(CN)₆] in the presence of GDH

通过循环伏安曲线,可以确定生物电化学法可以催化甘油脱氢酶辅基 PQQ 的再生,使膜结合甘油脱氢酶可以在只有电子媒介体存在而不添加任何辅酶的情况下连续催化甘油生成二羟基丙酮。

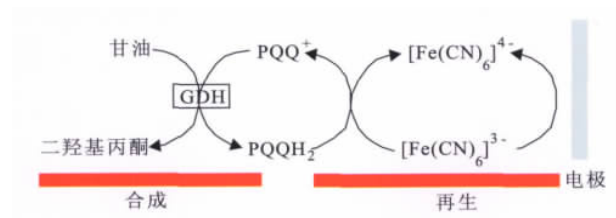


图3 生物电化学法催化甘油生成二羟基丙酮原理

Fig. 3 Bio-electrochemical preparation of DHA from glycerol using GDH

2.3 生物电化学反应

在生物电化学反应装置中加入含有 10 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$, 60 g/L 甘油的电化学反应液 55 mL, 加入 5 mL (约 5 U) 纯化后的甘油脱氢酶, 在 $(28 \pm 2)^\circ C$, 370 mV 电压下反应 18 h。甘油脱氢酶催化甘油生成 DHA 反应曲线见图 4。

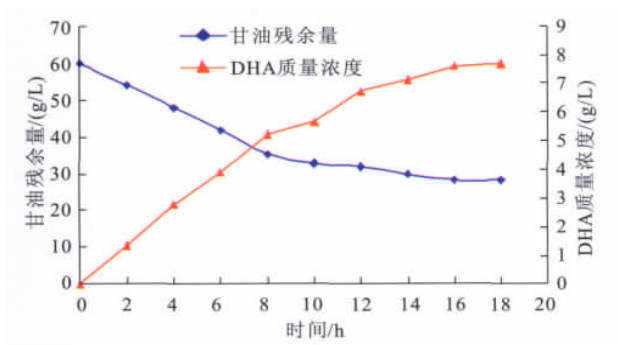


图4 生物电化学法生产 DHA 曲线

Fig. 4 Time courses of bio-electrochemical conversion of DHA using GDH

参考文献(References):

- [1] 宋如, 钱仁渊, 全艳, 等. 二羟基丙酮生产研究进展[J]. 化工技术与开发, 2009, 38(7): 25—30.
SONG Ru, QIANG Ren-yuan, TONG Yan, et al. Research advances in Dihydroxyacetone production[J]. Technology and Development of Chemical Industry, 2009, 38(7): 25—30. (in Chinese)
- [2] 方柏山, 陈宏文. 一种由生物催化转化甘油制备 1,3-丙二醇和二羟基丙酮的方法: CN1840668 A[P], 2006-01-27.
- [3] Nemeth A, Balassy A, Sevelia B. Difficulties and solutions for the assays of the key enzymes of a new enzymatic glycerol bioconversion[J]. Period Polytech Chem Eng, 2008, 52(1): 17—22.
- [4] 刘耀平, 徐明恺, 金玉兰, 等. 氧化葡萄糖杆菌酶学和分子生物学研究[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(3): 39—47.
LIU Yao-ping, XU Ming-kai, JIN Yu-lan, et al. Effect of antibiotics on pathogenic microbes [J]. Journal of Microbiology, 2003, 23(3): 39—47. (in Chinese)
- [5] Yang X P, Wei L J, Lin J P, et al. Membrane-bound pyroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase in *Gluconobacter*

- oxydans M5, responsible for production of 6-(2-hydroxyethyl) Amino-6-deoxy-L-sorbose[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008, 74(16): 5250—5253.
- [6] 韦柳静, 林金萍, 杨雪鹏, 等. 氧化葡萄糖酸杆菌 DSM 2003 膜结合乙醇脱氢酶的纯化鉴定和性质研究[J]. **食品科学**, 2010, 34(13): 164—168.
- WEI Liu-Jin, LIN Jin-Ping, YANG Xue-peng, et al. Purification, identification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 [J]. **Food Science**, 2010, 34(13): 164—168. (in Chinese)
- [7] Ameyama M, Shinafawa E, Matsushita K, et al. Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*[J]. **Agric BiolChem**, 1985, 49(4): 1001—1010.
- [8] 陈宏, 吴雅红, 吴振华, 等. 克雷伯杆菌甘油脱氢酶的分离纯化及性质[J]. **无锡轻工大学学报**, 2005, 24(1): 1—5.
- CHEN Hong, WU Ya-hong, WU Zhen-hua, et al. Purification and characterization of glycerol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2005, 24(1): 1—5. (in Chinese)
- [9] Lowry O, Rosebrough N, Farr A, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1951, 193(1): 265—275.
- [10] 郑裕国, 张霞, 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, 9(2): 124—127.
- ZHENG Yu-guo, ZHANG Xia, SHEN Yan-chu. Screening of 1,3-dihydroxyacetone producing strain using glycerol as bio-conversion substrate[J]. **Journal of Zhejiang University of technology**, 2001, 9(2): 124—127. (in Chinese)
- [11] 孙丽慧, 胡忠策, 郑裕国, 等. 微生物法生产 1,3-二羟基丙酮代谢工程研究进展[J]. **生物工程学报**, 2010, 26(9): 1218—1224.
- SUN Li-hui, HU Zhong-che, ZHENG Yu-guo, et al. progress in metabolic engineering of microbial production of 1,3-dihydroxyacetone[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2010, 26(9): 1218—1224. (in Chinese)

会议消息

会议名称(中文): 2012 年中国农业工程与食品工程国际学术会议

会议名称(英文): 2012 International Conference of Agricultural Engineering and Food Engineering, Harbin, China ICAE 2012

所属学科: 农林基础、作物学及林木育种、生物学、动物食品科学

开始日期: 2012—06—15

结束日期: 2012—06—17

主办单位: 黑龙江省欧美同学会哈尔滨高开区分会

全文截稿日期: 2012—05—10

论文录用通知日期: 2012—05—15

参会报名截止日期: 2012—05—20

[会务组联系方式] 联系人: 徐老师

联系电话: 86—451—87114528

E-MAIL: icae2012@163.com ; icae2011@163.com

会议网站: <http://iee2011.neau.edu.cn/>

会议背景介绍: 2012 年中国哈尔滨农业工程与食品工程国际学术会议(the 2012 International Conference of Agricultural Engineering and Food Engineering, Harbin, China ICAE 2012)将于 2012 年 6 月 15 日—17 日在中国哈尔滨召开。会议致力于推动现代农业工程技术、农业生物技术及食品工程的应用与发展,并构建与哈尔滨高开区企业的技术合作与交流的平台,促进科技成果的转化。ICAE 2012 会议将邀请国内外知名专家及企业精英,对国内外农业工程、农业生物技术、食品工程等方面的最新研究进展进行特邀报告。会议收集的论文将全部以美国电气和电子工程师协会(IEEE)论文集的形式全部刊发,并将全部被 EI 或 SCI 检索。