

文章编号:1009-038X(2005)01-0001-05

克雷伯杆菌甘油脱氢酶的分离纯化及性质

陈宏文^{1,2}, 吴雅红², 吴振华², 方柏山^{2*}, 胡宗定¹

(1. 天津大学 化工学院, 天津 300072; 2. 华侨大学 生物工程与技术系 福建 泉州 362011)

摘要: 在有氧条件下, 利用 Q Sepharose Fast Flow 离子交换层析和 Blue Sepharose CL-6B 亲和层析提纯克雷伯杆菌胞内甘油脱氢酶。酶的纯化倍数和回收率分别为 32.61 倍和 5.83%。通过 SDS-PAGE 电泳测得该酶亚基的相对分子质量约为 34 000。该酶最适表现反应温度和最适反应 pH 值分别为 60 °C 和 11。在 30 °C 以下及 pH 值 10~12 时, 该酶具有良好的稳定性。在 45 °C 和 pH 值 11 条件下, 该酶以甘油和 NAD⁺ 为底物的米氏常数 K_m 分别为 0.75 mmol/L 和 0.12 mmol/L。甘油脱氢酶对甘油的生理反应活性最大, 对其它醇类如 1,2-丙二醇、乙二醇也有氧化能力。NH₄⁺ 和 Na⁺ 对酶有显著激活作用。巯基保护剂可明显地提高酶的活力。

关键词: 甘油脱氢酶; 克雷伯杆菌; 纯化

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Purification and Characterization of Glycerol Dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*

CHEN Hong-wen^{1,2}, WU Ya-hong², WU Zhen-hua², FANG Bai-shan², HU Zong-ding¹

(1. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Department of Bioengineering & Biotechnology, Hua Qiao University, Quanzhou 362011, China)

Abstract: Glycerol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* was purified to homogeneity by Q Sepharose Fast Flow ion-exchange chromatography and Blue Sepharose CL-6B affinity chromatography under aerobic conditions. A 32.61 fold purification was obtained with the recovery of 5.83% activity. The subunit molecular weight of enzyme was 34 000. The optimum temperature and pH of the enzyme activity were 60 °C and pH 11. Below 30 °C and at range of pH 10~12, glycerol dehydrogenase was stable. At 45 °C and pH 11, the K_m for glycerol and NAD⁺ were 0.75 mmol/L and 0.12 mmol/L, respectively. The enzyme oxidized other alcohols such as 1,2-propanediol and ethylene glycol, besides the physiological substrate glycerol. The enzyme was significantly activated by NH₄⁺, Na⁺, K⁺ and Mg²⁺. Reducing agents enhanced glycerol dehydrogenase

Key words: glycerol dehydrogenase; *Klebsiella pneumoniae*; purification

收稿日期:2004-09-04; 修回日期:2004-10-24.

基金项目:国家自然科学基金项目(20276026)、福建省自然科学基金项目(D0120002)和福建省科学技术重点基金项目(20031020)资助课题。

作者简介:陈宏文(1969-),女,浙江德清人,讲师,生化工程博士研究生;*通讯作者。

甘油脱氢酶(GDH)主要催化甘油生成二羟基丙酮(DHA)。根据催化反应中产物和电子受体的不同, GDH可分为3种类型: 第一种为依赖 NAD^+ 的 GDH(EC1.1.1.6), 将甘油转化为 DHA, DHA 进一步磷酸化, 进入糖酵解途径, 作为碳源为微生物生长提供 ATP 和 NADH。这种 GDH 主要存在于各种细菌中, 如 *Aerobacter aerogenes*、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis* 和 *Cellulomonas sp.* 等。第二种为依赖 NADP^+ 的 GDH(EC1.1.1.72 和 EC1.1.1.56), 它将甘油氧化为 DHA 或甘油醛, 这类 GDH 大多存在于霉菌和动物组织中^[1]。第三种为不依赖辅酶位于细胞膜上的 GDH, 也可将甘油转化为 DHA, 在醋酸菌中发现存在这类 GDH^[2]。除具有生成 DHA 能力外, GDH 在医学诊断分析中也得到广泛应用, 如酶法分析血脂含量。此外, 能将甘油转化为 1,3-丙二醇的主要微生物(如克雷伯杆菌属、柠檬菌属及梭状芽孢杆菌属)普遍含有第一种 GDH, 它与甘油脱水酶、1,3-丙二醇氧化还原酶构成合成 1,3-丙二醇的关键酶系。因此, 近年来有关 GDH 的研究与开发日益受到重视^[3-5]。

克雷伯杆菌是兼性厌氧菌, 是生产 1,3-丙二醇的重要菌株, 目前国内尚未见关于该菌种的 GDH 报道。在前期研究工作中, 通过优化发酵条件, 克雷伯杆菌中甘油脱氢酶的活力可达到 9.16 U/mg^[6]。作者对来源于克雷伯杆菌胞内的 GDH 进行纯化并对其酶学性质进行研究。大多数用于 GDH 纯化的细菌是严格厌氧的, 作者在研究中发现 GDH 却对氧气有一定耐受力, 因此纯化过程均在有氧条件下进行。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和试剂

制备型全自动液相色谱系统 ÄKTA Purifier 100、HiTrap IEX Selection Kit、XK16/20 色谱柱、Q Sepharose Fast Flow 和 Blue Sepharose CL-6B 层析介质、低相对分子质量 SDS 蛋白 Marker (14~97 000) 和高相对分子质量非变性蛋白质 Marker (66~669 000); 瑞典安玛西亚公司产品; 小型垂直电泳系统 Thermo EC120、电源 Thermo EC250-90; 美国 Thermo EC 公司制造; JY92-II 超声波细胞粉碎机; 宁波新芝生物科技股份有限公司制造; 联机紫外可见光分光光度计 UV-2401(PC)S 及恒温水浴装置 TB-85; 日本岛津公司制造; 高速冷冻离心机 3K30; 德国 Sigma 公司制造; 其它试剂购自上海化学试剂公司, 均为市售分析纯或化学纯。

万方数据

1.2 菌种和培养方法

克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* DSM 2026): 德国生物技术中心曾安平博士赠送。

细胞培养和无细胞抽提液制备方法见文献[6]。

1.3 GDH 活力测定

参考 Ahrens K^[7] 的方法并适当修改。GDH 使甘油脱氢生成二羟基丙酮, 辅酶 I NAD^+ 作为受体得氢被还原为 NADH, NADH 在 340 nm 的紫外光下有最大吸收。根据吸光度的增加情况, 用初速度法测定 GDH 的活力。1.5 mL 反应液含有 30 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2 mol/L 甘油、2 mmol/L NAD、1 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 、0.1 mol/L 碳酸钾缓冲溶液 (pH 12.0) 以及测定时加入的适量酶液。45 $^{\circ}\text{C}$ 下, 加入适量酶液启动反应, 于 340 nm 波长下测定吸光度, 连续测 6 min, 每隔 6 s 读取数据, 根据式(1)计算酶活。GDH 的活力定义为: 在上述条件下, 每分钟还原 1 μmol 甘油的酶量为 1 个单位。酶的比活力为每毫克蛋白质所含酶的单位数 (U/mg)。酶活计算公式如下:

$$\text{酶活力单位(U/mL)} = (V_T \times \Delta A \times K) / (\epsilon \times V_S) \quad (1)$$

其中, V_T : 反应液总体积; V_S : 抽提液样品体积; ΔA : 每分钟吸光度变化值; K : 样品稀释倍数。

$$\epsilon_{340\text{ nmNADH}} = 6.3 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$$

1.4 蛋白质质量分数测定

采用 Bradford 法测定^[8], 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.5 电泳分析

酶的纯度及相对分子质量测定采用连续 PAGE、SDS-PAGE 方法进行^[8], 连续 PAGE 分离胶质量浓度 6 g/dL, SDS-PAGE 分离胶质量浓度 12 g/dL, 浓缩胶质量浓度 5 g/dL。

2 结果与讨论

2.1 甘油脱氢酶的分离纯化

2.1.1 Q Sepharose Fast Flow 离子交换层析 取 6 mL 无细胞抽提液上样到已被 50 mmol/L PBS (pH 7.0, 含 2 mmol/L 二硫代苏糖醇) 充分平衡的 Q Sepharose Fast Flow 1 mL 预装柱, 采用 10 个柱体积的 0~1 mol/L KCl 线性梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 分部收集 (1 mL/管), 测定各管 GDH 酶活。GDH 在 KCl 浓度约 0.3 mol/L 处得到洗脱, 洗脱曲线见图 1。

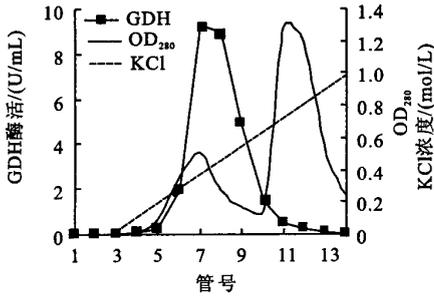


图 1 Hitrap Q FF KCl 线性洗脱曲线

Fig. 1 Hitrap Q FF chromatography

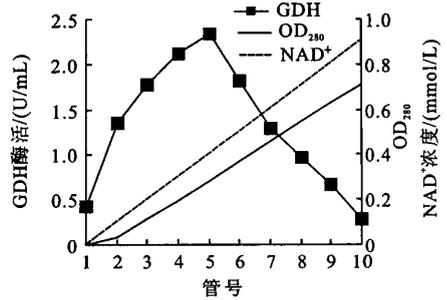


图 2 Blue Sepharose CL-6B NAD+ 线性洗脱曲线

Fig. 2 Blue Sepharose CL-6B chromatography

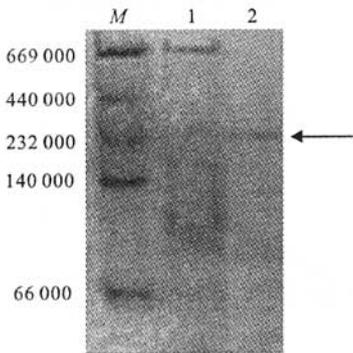
2.1.2 Blue Sepharose CL-6B 亲和层析 合并经离子交换洗脱具有较高酶活力的洗脱液,上样到 Blue Sepharose CL-6B 层析柱(1.6 cm×4 cm),用 10 个柱体积 0~2 mmol/L NAD⁺ 线性梯度洗脱,体积流量 2 mL/min,分部收集(4 mL/管),测定各管 GDH 酶活,洗脱曲线见图 2。

经过上述步骤,样品 PAGE 和 SDS-PAGE 显示单一条带(图 3,4),GDH 达到电泳纯,纯化过程中蛋白质质量分数及 GDH 活力变化见表 1。酶的纯化倍数和回收率分别为 32.61 倍和 5.83%。

表 1 克雷伯杆菌 GDH 的纯化

Tab. 1 Purification of glycerol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*

步骤	总蛋白质质量/mg	总酶活/U	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	比活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗提液	80.59	88.97	13.43	1.10	100	1
离子交换层析	5.62	32.45	0.94	5.77	36.47	5.23
亲和层析	0.14	5.18	0.036	36.00	5.83	32.61



M. 相对分子质量 Marker; 1. Q Sepharose Fast Flow 离子交换层析蛋白质带; 2. Blue Sepharose CL-6B 亲和层析蛋白质带

图 3 甘油脱氢酶 PAGE 电泳图

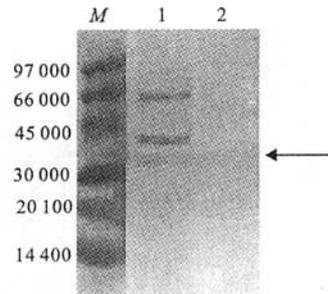
Fig. 3 Molecular weight of glycerol dehydrogenas by PAGE

2.2 甘油脱氢酶的性质

2.2.1 相对分子质量 由 SDS-PAGE 结果计算出 GDH 亚基相对分子质量约为 34 000,与已知微生物来源的 GDH 相对分子质量相似(*E. coli* 中 GDH 为 39 000^[9], *Cellulomonas sp.* 中 GDH 为 42 000^[10], *Citrobacter freundii* 中 GDH 为 43 000^[5]).

2.2.2 最适反应温度及热稳定性 在 pH 值 12 的条件下,分别在 28~65 °C 下测定酶的活力,结果见
万方数据

图 5。60 °C 时 GDH 活力最大,65 °C 时酶相对活力仍有 70%,说明 GDH 能在较高的温度下进行反应。



M. 相对分子质量 Marker; 1. Q Sepharose Fast Flow 离子交换层析蛋白质带; 2. Blue Sepharose CL-6B 亲和层析蛋白质带

图 4 甘油脱氢酶 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 Molecular weight of glycerol dehydrogenas by SDS-PAGE

为了考察酶的热稳定性,分别在 30, 45, 50 °C 测定酶的残余活力,结果见图 6。设酶失活符合一级失活动力学方程,则 30, 45, 50 °C 酶活力半衰期分别为 19.3, 3.6, 2.9 h,说明 GDH 在 30 °C 具有较好的热稳定性。因此在实际的反应中,考虑到酶的稳定性的,反应温度为 30~40 °C。

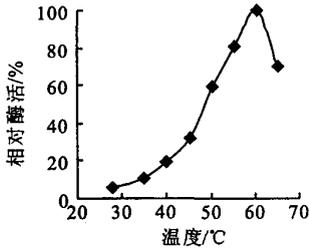


图5 温度对甘油脱氢酶活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the activity of glycerol dehydrogenase

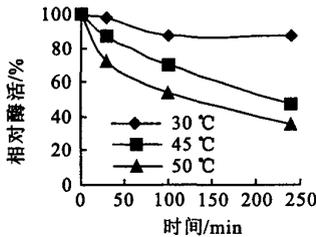


图6 温度对甘油脱氢酶热稳定性的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the thermal stability of glycerol dehydrogenase

2.2.3 最适反应 pH 值及其稳定性 45 °C 下,测定缓冲液不同 pH 值时酶的活力,结果见图 7. 最适反应 pH 值为 11. 在 pH 10~12 范围内酶保持稳定 (45 °C 2 h)(见图 8),中性和酸性环境不利于酶的活性保持,尤其是在酸性条件下,酶活损失很大, pH 值为 5 的条件下,残余酶活仅为 5% 左右. GDH 催化反应耐强碱、耐较高温度,说明 GDH 存有较大的工业应用价值.

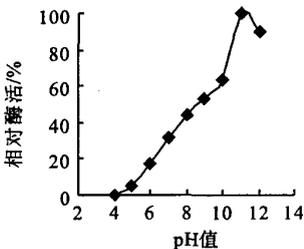


图7 pH 值对甘油脱氢酶活性的影响

Fig. 7 Effects of pH on the activity of glycerol dehydrogenase

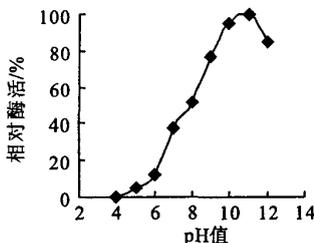
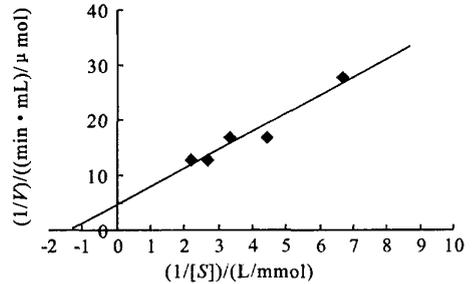
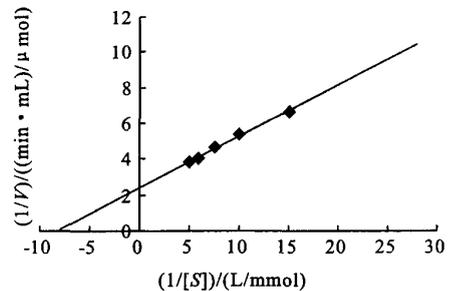


图8 pH 值对甘油脱氢酶稳定性的影响

Fig. 8 Effect of pH on the stability of glycerol dehydrogenase
万方数据

2.2.4 动力学参数的测定 在 pH 11.45 °C 下,测定不同底物浓度(另一种底物为饱和浓度)下的酶活力,以 $1/V$ 和 $1/[S]$ 作 Lineweaver Burk 双倒数图,得到 K_m 甘油, K_m NAD⁺ 分别为 0.75 mmol/L, 0.12 mmol/L, V_{max} 甘油, V_{max} NAD⁺ 分别为 0.23 μ mol/(mL·min), 0.42 μ mol/(mL·min), 结果见图 9, 10. K_m 甘油 均小于来源于 *Clostridium butyricum*^[4], *Citrobacter freundii*^[5], *Cellulomonas sp.*^[10] 等的 K_m 甘油, 说明克雷伯杆菌中 GDH 对甘油的亲和力较大, K_m NAD⁺ 则没有明显规律. 对于不同的底物, K_m NAD⁺ 小于 K_m 甘油, 与大多数文献报道相同, 说明 GDH 对 NAD 的亲和力大于甘油, 由此可以推断它的催化机制可能是 GDH 先与 NAD⁺ 结合, 然后再与甘油结合发生催化反应.

图9 双倒数法测 GDH 的 K_m 甘油Fig. 9 Double reciprocal plot for K_m glycerol图10 双倒数法测 GDH 的 K_m NAD⁺Fig. 10 Double reciprocal plot for K_m NAD⁺

2.2.5 酶对底物的专一性 选择甘油、1,2-丙二醇及其它结构相似的醇类作为底物,考察 GDH 的底物专一性(以甘油酶活力为 100%),结果见表 2. 由表 2 可知, GDH 对含有相邻羟基的醇类有较强的专一性,对底物甘油活性最大,其次是 1,2-丙二醇、乙二醇. GDH 相对较低的底物专一性与已知的大多数 GDH 一致. GDH 对单羟基的乙醇、甲醇、正丙醇、异丙醇、正戊醇和非相邻羟基的 1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,3-丙二醇以及糖醇活性则很低.

表 2 甘油脱氢酶的底物专一性
Tab. 2 Substrate specificity of GDH

底物	相对酶活/%
甘油	100
1,2-丙二醇	60
乙二醇	47
乙醇	5
甲醇	3
1,3-丁二醇	5
1,4-丁二醇	4
1,3-丙二醇	2
正丙醇	0
异丙醇	0
正戊醇	0
木糖醇	0

2.2.6 金属离子对酶的影响 在含有不同 10 mmol/L 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. 反应液中还含有 0.1 mol/L 的甘油、2 mmol/L 的 NAD^+ 和 100 mmol/L 碳酸盐缓冲液,结果见表 3. 由表 3 可知, NH_4^+ 、 Na^+ 对 GDH 有激活作用且 NH_4^+ 激活效果最显著,这与 *Cellulomonas sp.*^[10], *Aerobacter aerogenes*^[11], *E. coli*^[9] 中的 GDH 一致. Mg^{2+} 对 GDH 没有影响, Li^+ , Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 表现出 51%~86% 的相对活力. GDH 会受到 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 的抑制,与文献[5]报道的 *Citrobacter freundii* 一致. 另据文献报道,细菌中的 GDH 会受到巯基结合试剂如对羟基汞基苯甲酸的强烈抑制,并据此推断 GDH 的活性中心含有巯基. 作者在实验中加入 2 mmol/L 的巯基保护剂如 DTT,确实发现对 GDH 有显著的激活作用,酶活性提高两倍,进一步证明 GDH 的活性

中心含有巯基并受到了 DTT 的保护,免遭氧化破坏.

表 3 金属离子对甘油脱氢酶的影响
Tab. 3 Effects of various metal ions on GDH

离子	相对酶活/%
对照	100
NH_4^+	137
Na^+	104
Li^+	51
Mn^{2+}	78
Mg^{2+}	100
Ca^{2+}	86
Zn^{2+}	20
Fe^{2+}	35

3 结 论

在有氧条件下,利用 Q Sepharose Fast Flow 离子交换层析和 Blue Sepharose CL-6B 亲和层析提纯克雷伯杆菌胞内甘油脱氢酶,与大多数文献报道的严格厌氧操作条件相比,方法更加简单,易于实现工业化. 在纯化过程中,通过对离子交换层析 pH 值的细致摸索,使得与 GDH 性质接近的 1,3-丙二醇氧化还原酶穿透离交柱而 GDH 保留在离交柱上,从而分离到纯化的 GDH. 酶的纯化倍数和回收率分别为 32.61 倍和 5.83%. GDH 最适表观反应温度和最佳反应 pH 值分别为 60 °C 和 11. 在 30 °C 以下及 pH 10~12,该酶具有良好的稳定性. GDH 催化反应耐强碱、耐较高温度,说明 GDH 有较大的工业应用价值.

参考文献:

- [1] Yamada H, Nagao A, Nishise H, et al. Formation of glycerol dehydrogenase by microorganisms [J]. *Agric Biol Chem*, 1982, 46(9): 2325-2331.
- [2] Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K, et al. Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*[J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(4): 1001-1010.
- [3] Ruzhenikov S N, Burke J, Sedelnikova S, et al. Glycerol dehydrogenase structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase[J]. *Structure*, 2001, 9: 789-802.
- [4] Malaoui H, Marczak R. Separation and characterization of 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D[J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 90:1006-1014.
- [5] Daniel R, Stuertz K, Gottschalk G. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*[J]. *J Bacteriol*, 1995, 177 (15): 4392-4401.
- [6] 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.

(下转第 37 页)

2) 改性产物与对照组均经过洗涤工序,洗涤对溶胶的粘度稳定性影响较大,经过洗涤的比未经洗涤的溶胶粘度增加。洗涤对维持精粉溶液稳定性也有利,其原因是洗涤在去除杂质、纯化精粉的同时,还大大降低了魔芋葡甘聚糖中微生物的总量。

3) 六偏磷酸钠(SHMP)改性后的产物在 35 ℃ 条件下放置 120 h,粘度基本没有变化,无分层、发臭和腐败现象,溶胶稳定性好;而用其他改性剂改

性得到的产物溶液放置 72 h 后即开始变稀、变臭。

4) 六偏磷酸钠与魔芋葡甘聚糖的酯化产物中带有磷酸基团,溶液冻融稳定性良好,细菌、霉菌、酵母总数较小,产物具有一定的耐酸、耐高温能力。经磷酸基团酯化后,增加了保水、亲水性能,产物在冷冻条件下不易发生凝沉,冻融稳定性提高,适用于冷冻食品等行业。

参考文献:

- [1] Mosakira Maeds. Detailed exzamination of the branched structure of konjac glucomannan[J]. *Agric Biol Chem*, 1980, 44 (2):245.
- [2] 王文晟. 没食子酸(TNC)对魔芋葡甘聚糖干法改性的研究[J]. *食品科学*, 1994, (7):3.
- [3] 胡耀星. 魔芋葡甘聚糖马来酸酐酯化反应的研究[J]. *食品科学*, 1992, (4):5.
- [4] 胡敏. 魔芋葡甘聚糖磷酸盐酯化反应研究(II)[J]. *武汉大学学报(自然版)*, 1994, (3):101.
- [5] 尉芹. 几种改性魔芋葡甘聚糖的生产工艺及其性能的研究[J]. *西北林学院学报*, 1996, (1):86-92.
- [6] 胡敏. 魔芋葡甘聚糖磷酸酯化反应研究[J]. *天然产物研究与开发*, 1990, 2(2):8.
- [7] 张昌军. 新型絮凝剂魔芋葡甘聚糖酯化的研制[J]. *化学世界*, 1994, (2):83.
- [8] 胡平藩. 印花糊料[M]. 北京:纺织工业出版社, 1988.
- [9] 孙远明, 庞杰. 魔芋葡甘聚糖改性及其应用[J]. *中国食品学报*, 1998, 2(2):58.
- [10] 孙远明, 刘佩瑛, 张盛林. 魔芋葡甘聚糖的分光光度法测定[J]. *植物生理学通讯*, 1991, 27(3):219.
- [11] 廖春燕, 马国瑞, 陈美慈, 等. 不同分子量壳聚糖对几种植物病原真菌的拮抗作用[J]. *浙江农业学报*, 2001, 13(3):172.

(责任编辑:朱明)

(上接第 5 页)

- [7] Ahrens K, Menzel K, Zeng A P, *et al.* Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella Pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation [J]. *Biotech Bioeng*, 1998, 59(5):544-552.
- [8] 汪家政. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000. 42-47.
- [9] Tang C T, Ruch F E, Lin E C C. Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism[J]. *J Bacteriol*, 1979, 140:182-187.
- [10] Yamada H, Nagao A, Nishise H, *et al.* Glycerol dehydrogenase from *Cellulomonas sp.* NT3060: purification and characterization[J]. *Agric Biol Chem*, 1982, 46(9):2333-2339.
- [11] Lin E C C, Magasanik B. The activation of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by monovalent cations[J]. *J Biol Chem*, 1960, 235(6):1820-1823.
- [12] Tang C T, Ruch F E, Lin E C C. Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism[J]. *J Bacteriol*, 1979, 140:182-187.

(责任编辑:李春丽)