



普通生酮基古龙酸菌中山梨糖脱氢酶和山梨酮脱氢酶的纯化及酶学性质分析

高媛, 曾伟主, 周景文, 陈坚*

工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】对源于普通生酮基古龙酸菌(*Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001)的山梨糖脱氢酶(Sorbose dehydrogenase, SDH)和山梨酮脱氢酶(Sorbosone dehydrogenase, SNDH)的酶学性质进行分析。【方法】以 *K. vulgare* WSH-001 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到山梨糖脱氢酶基因(*sdh*)和山梨酮脱氢酶基因(*sndh*), 构建重组表达质粒 pET28a-*sdh*、pET28a-*sndh*, 并分别转入大肠杆菌 BL21(DE3)中。利用镍柱亲和层析和凝胶过滤层析得到纯化的 SDH 和 SNDH。【结果】成功构建产 SDH 和 SNDH 的大肠杆菌 BL21(DE3)并对目的酶进行纯化。SDS-PAGE 分析结果表明, SDH 和 SNDH 的大小分别为 64 kDa 和 48 kDa, 与理论预测值一致。显色法测得 SDH 酶活为 3.15 U/mg, 最适反应温度为 30 °C, 最适反应 pH 为 8.0 左右; SNDH 酶活为 6.12 U/mg, 最适反应温度为 35 °C, 最适反应 pH 为 8.0 左右。在 pH 3.0、4.0、5.0 的偏酸性条件下, 2 个酶的酶活受到显著影响。【结论】表达并纯化了来源于普通生酮基古龙酸菌来源的 SDH、SNDH, 并进行了酶学性质分析, 为利用 SDH、SNDH 实现维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸的一步法发酵生产提供了必要的参考。

关键词: 氧化葡萄糖酸杆菌, 2-酮基-L-古龙酸, 山梨糖脱氢酶, 山梨酮脱氢酶

维生素 C, 又称 L-抗坏血酸, 是人类及灵长类的一种外源性营养物^[1]。维生素 C 是生物体内氧化还原反应的重要成员, 在生物体内参与多种氧化还原反应, 具有较强的还原性^[2], 被广泛应用于食品、化妆品和医药等行业^[3]。2-酮基-L-古龙酸(2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG), 是工业生产维

生素 C 的直接前体。目前工业化生产 2-KLG 采用二步发酵法^[4-5], 二步发酵法涉及两步三菌, 即: (1) 氧化葡萄糖酸杆菌(*Glucobnobacter oxydans*)将底物 D-山梨醇转化为 L-山梨糖^[4,6-7], 几乎所有的山梨醇都能有效转化; (2) 普通生酮基古龙酸菌(*Ketogulonicigenium vulgare*)和巨大芽孢杆菌

基金项目: 国家“973 项目”(2014CB745100); 全国博士学位论文作者专项资金(201256); 国家自然科学基金(21390204); 江苏省科技支撑计划(BE2014698)

*通信作者。Tel: +86-510-85913661; Fax: +86-510-85913661; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-11-25; 修回日期: 2017-02-09

(*Bacillus megaterium*)构成的混菌体系将 L-山梨糖转化为 2-酮基-L-古龙酸^[8]。

在二步发酵法中主要包括 3 种重要的脱氢酶系, 分别为山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SLDH)、山梨糖脱氢酶(sorbose dehydrogenase, SDH)和山梨酮脱氢酶(sorbose dehydrogenase, SNDH)。在 *K. vulgare* 中, 已经证实有脱氢酶可以将 L-山梨糖转化为 L-山梨酮, 再进一步将 L-山梨酮转化为 2-KLG^[9]。随着生物技术的发展, 越来越多的菌株得到了基因组序列, 很多和 SLDH、SDH、SNDH 具有较高同源性的脱氢酶可以在 NCBI、KEGG 或者 BRENDA 等数据库中检索到, 但是大部分均未经过实验验证。因此, 这些脱氢酶的鉴定及酶学性质分析, 对构建 2-KLG 一步生产菌株及其发酵条件优化至关重要。

本实验室前期研究中, 曾对 1 株 *K. vulgare* WSH-001 菌株进行了全基因组测序, 发现该菌细胞膜上存在大量参与不完全氧化还原反应的脱氢酶^[10], 预测其中 7 个基因编码山梨糖脱氢酶(SDH)或山梨酮脱氢酶(SNDH), 并进行了验证实验^[11]。为得到 1 株能将 D-山梨醇直接转化为 2-酮基-L-古龙酸的生产菌株, 将上述 SDH 和 SNDH 基因通过质粒表达于 *G. oxydans* WSH-003 中, 获得 1 株

2-KLG 产量达 39.2 g/L 的菌株^[12]。

在利用 *G. oxydans* WSH-003 发酵生产 L-山梨糖的过程中发现, 发酵初始 pH 值为 4.5 左右, 且 pH 逐渐降低; 而对混菌生产 2-KLG 的研究过程发现, 发酵产酸较合适的 pH 值为 5–8, 控制发酵过程 pH 值为 6.7–7.0 可获得较大转化率^[1,13–14]。脱氢酶 SDH 和 SNDH 的异源表达, 导致此两种酶所处的环境发生变化, 可能会影响酶的催化活性进而影响山梨糖到 2-KLG 的转化效率(表 1)。因此, 本文以 SDH 和 SNDH 为对象, 将源于 *K. vulgare* WSH-001 中的 k0203 (编码 SDH)、k0095 (编码 SNDH)在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)中进行表达, 并对 SDH 和 SNDH 进行纯化及酶学性质的分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌 JM109 由本实验室保存, 用于质粒的构建; 大肠杆菌 BL21(DE3)由本实验保藏, 用于蛋白质表达; *K. vulgare* WSH-001 来自于江苏江山制药有限公司。pMD19-T Simple 购自 TaKaRa (大连)有限公司, pET-28a(+)为本实验室保藏。

表 1. 典型山梨糖脱氢酶和山梨酮脱氢酶的酶学性质
Table 1. Enzyme characteristics of typical SDH and SNDH

Names	Sources	Molecular weight/kDa	K_m /(mmol/L)	Optimum pH	Optimum temperature/°C
L-sorbose dehydrogenase ^[15]	<i>Gluconobacter oxydans</i> SCB329	60.000	52.70	Around 7.0	42
L-sorbose dehydrogenase ^[16]	<i>Ketogulonigenium</i> sp. WB0104	60.499	23.94	5.5–6.5	40–50
L-sorbose dehydrogenase ^[17]	<i>Sinorhizobium</i> sp. 97507	–	64.20	–	–
L-sorbose dehydrogenase ^[18]	<i>Gluconobacter oxydans</i>	58.000	–	7.0	50
L-sorbose dehydrogenase ^[19]	<i>Acetobacter liquefaciens</i> IF012258	50.000	–	–	–
L-sorbose dehydrogenase ^[20]	<i>Ketogulonigenium vulgare</i> Y25	43.100	–	–	–
Sorbose/sorbose dehydrogenase ^[9]	<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 4025	62.500	–	7.0–9.0	–

1.1.2 主要试剂: PrimeSTAR HS DNA polymerase、DNA 连接酶, TaKaRa (大连)有限公司; $2\times$ Taq Master Mix DNA 聚合酶, 杭州宝赛生物科技有限公司; 限制性内切酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, Thermo Scientific 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、细菌质粒小量抽提试剂盒、感受态细胞制备试剂盒, 上海生工生物有限公司; 标准分子量蛋白、蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 预制胶, Life Technologies 公司。

1.1.3 培养基及缓冲液: LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5、蛋白胨 10、NaCl 10, ddH₂O 1 L; 固体培养基添加琼脂条 20, 121 °C 灭菌 15 min。

TB 培养基(g/L): 酵母提取物 24、蛋白胨 12、甘油 4 mL/L、KH₂PO₄ 2.3、K₂HPO₄ 16.4, ddH₂O 1 L; 121 °C 灭菌 15 min。

Binding buffer (mmol/L): NaH₂PO₄ 50, NaCl 300, 咪唑 10, 用 NaOH 调至 pH 8.0。

Wash buffer (mmol/L): NaH₂PO₄ 50, NaCl 300, 咪唑 20, 用 NaOH 调至 pH 8.0。

Elution buffer (mmol/L): NaH₂PO₄ 50, NaCl 300, 咪唑 250, 用 NaOH 调至 pH 8.0。

1.2 载体构建

根据山梨糖脱氢酶基因 *sdh* (NCBI 登录号为 AEM40042.1)和山梨酮脱氢酶基因 *sndh* (NCBI 登录号为 AEM39934.1)的基因序列, 设计引物 *sdh*-F、*sdh*-R 及 *sndh*-F、*sndh*-R (表 2)。以 *K. vulgare* WSH-001 基因组为模板, *sdh*-F、*sdh*-R 为引物扩增大小为 1737 bp 的 *sdh* 基因; 以 *K. vulgare* WSH-001 基因组为模板, *sndh*-F、*sndh*-R 为引物扩增大小为 1290 bp 的 *sndh* 基因。*sdh* 及 *sndh* 基因先连接到 pMD19-T Simple 上得到 T-*sdh*、T-*sndh*。测序正确后, 用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, 并连入表达载体 pET-28a(+), 转化入 *E. coli*

表 2. 本研究中所用引物

Table 2. Primes used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites
<i>sdh</i> -F	GGAATTCCATATGAAACTGA CGACCCTGCTG	<i>Nde</i> I
<i>sdh</i> -R	CCCAAGCTTTTACTGCTGCG GCAGAGC	<i>Hind</i> III
<i>sndh</i> -F	GGAATTCCATATGAGCGTTCT GGCCAAATTC	<i>Nde</i> I
<i>sndh</i> -R	CCCAAGCTTTTACGCAGCGG AAATCCGCCA	<i>Hind</i> III

The underlined are restriction enzyme cutting sites.

BL21(DE3), 取菌液提取质粒, 对质粒进行双酶切实验, 核酸电泳验证阳性转化子。

1.3 诱导表达及粗酶液制备

从 LB 固体平板上挑取大肠杆菌 BL21(DE3) 单菌落转接于 LB 液体培养基中(加入终浓度为 50 µg/mL 的卡那霉素), 37 °C、220 r/min 条件下培养 12 h 后, 以 1% 的接种量转接至 TB 培养基中, 30 °C、220 r/min 条件下培养 3 h 至菌体 $OD_{600}\approx 0.6$ 时, 向培养基中添加终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。为促进蛋白的可溶性表达, 加入 IPTG 后, 培养温度降低至 20 °C。

取培养 12 h 的菌体, 4 °C、5000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 将收集到的菌体用 Binding buffer 缓冲液清洗 2 次, 重悬至菌体浓度为 $OD_{600}\approx 20$, 冰上放置超声破碎 15 min 后, 4 °C、10000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片, 采用微孔滤膜(0.45 µm)过滤除去杂质, 得到粗酶液。

1.4 SDH 及 SNDH 的分离纯化

首先利用 Ni-NTA 亲和层析柱(QIAGEN)对粗酶液进行纯化: 首先用 Binding buffer 平衡 2 个柱体积; 将 1.3 中得到的粗酶液上样 5 mL; 然后用 Wash buffer 冲洗 5 个柱体积; 再用 Elution buffer 洗脱 5 个柱体积; 最后用纯水冲洗 5 个柱体积后

再用 20%乙醇冲洗 3 个柱体积, 卸下柱子保存。

以上步骤中, 流速均为 1 mL/min。

进一步利用分子筛(HiLoad 16/60 Superdex 200)进行纯化: 首先用不加咪唑的 Wash buffer 平衡 1.5 个柱体积; 将上面经过 Ni-NTA 亲和层析柱(QIAGEN)获得的酶液经超滤管浓缩后进样 1 mL; 然后用 1.2 个柱体积的不加咪唑的 Wash buffer 进行洗脱; 再用纯水冲洗和用 20%乙醇各冲洗 1.5 个柱体积, 保存柱子。以上步骤中, 流速均为 1 mL/min。

对得到的洗脱峰进行酶活及 SDS-PAGE 分析。

1.5 酶活测定及酶学性质分析

在 620 nm 可见光波长下可以通过检测 DCIP-PMS 显色剂的褪色速率来测定 SDH 及 SNDH 的酶活^[21]。显色剂配制: 0.0116 g DCIP、0.0612 g PMS、0.0048 g MgSO₄ 溶于 5 mL 50 mmol/L pH 7.0 的 PBS 缓冲液中。反应底物: L-山梨糖或乙二醛(乙二醛代替 L-山梨酮用于测定 SNDH 酶活)^[22]溶于 50 mmol/L PBS 缓冲液中, L-山梨糖或乙二醛终浓度为 200 mmol/L。

取纯化后的酶液 15 μ L 加 5 μ L 10 mg/L PQQ 在 30 °C 条件下孵育 10 min 变为全酶, 加入 100 μ L 显色剂及 900 μ L 反应底物后混匀, 取 200 μ L 加入 96 孔板中, 在 OD₆₂₀ 滤镜下每 10 s 检测反应液褪色情况, 检测 10 次。1 个 L-山梨糖脱氢酶(或 L-山梨酮脱氢酶)酶活定义为 30 °C 条件下每分钟还原 1 μ mol DCIP 的酶量, 等同于每分钟氧化 1 μ mol 底物 L-山梨糖(或乙二醛)的酶量。

1.6 酶反应动力学参数测定

在酶反应体系中分别添加山梨糖和乙二醛, 使其终浓度为 25、50、100、150、200 mmol/L, 于最适反应条件及最适反应 pH 条件下测定其初始反应速率^[11]。

1.7 SDH、SNDH 体外催化反应

将 SDH 与 SNDH 混合后加入 PQQ 孵育后变为全酶, 参照 1.5 中酶活测定方法, 以 L-山梨糖为底物, 对其组合催化 L-山梨糖生成 2-KLG 的能力进行测定。

1.8 液相检测条件

高效液相色谱仪 Agilent 1260, 检测器为示差折光检测器, 色谱柱为 Aminex HPX-87H (Bio-Rad), 流动相为 5 mmol/L 的 H₂SO₄, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 10 μ L。

2 结果和分析

2.1 表达载体的构建

分别以限制性内切酶 *Nde* I、*Hind* III 双酶切 T-*sdh*、T-*sndh* 以及 pET-28a(+), *sdh* 和 *sndh* 两片段与 pET-28a(+)连接后转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中, 得到重组表达质粒 pET28a-*sdh* 和 pET28a-*sndh*。提取质粒后用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切验证, 核酸电泳得到大小为 1800 bp 和 1400 bp 左右的条带, 分别与 *sdh* 和 *sndh* 大小一致(图 1)。

2.2 诱导表达及纯化

将 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*sdh* 及 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*sndh* 单菌落接种于 LB 液体培养基中, 培养 12 h 后转接至 TB 培养基中, 待菌体 OD₆₀₀ 达到约 0.6 时, 添加终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 诱导温度为 20 °C。取培养 12 h 的细胞, 用 Binding buffer 洗涤 2 次后, 取 OD₆₀₀=2 的菌体细胞进行 SDS-PAGE 分析 *sdh* 和 *sndh* 在 *E. coli* 中的表达情况, 对全细胞分析可见大小约为 64 kDa 和 48 kDa 的蛋白条带与 SDH 及 SNDH 的理论预测值相符(图 2 条带 1、4), 表明 *sdh* 和 *sndh* 基因在 *E. coli* 中得到了表达。

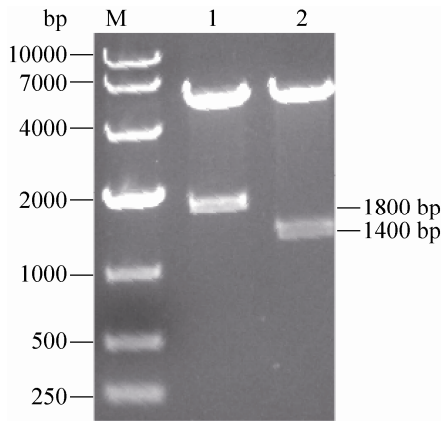


图 1. 表达载体酶切验证琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of expression vectors. M: DL10000 DNA marker; 1: Recombinant plasmid pET28a-sdh digested by *Nde* I and *Hind* III; 2: Recombinant plasmid pET28a-sndh digested by *Nde* I and *Hind* III.

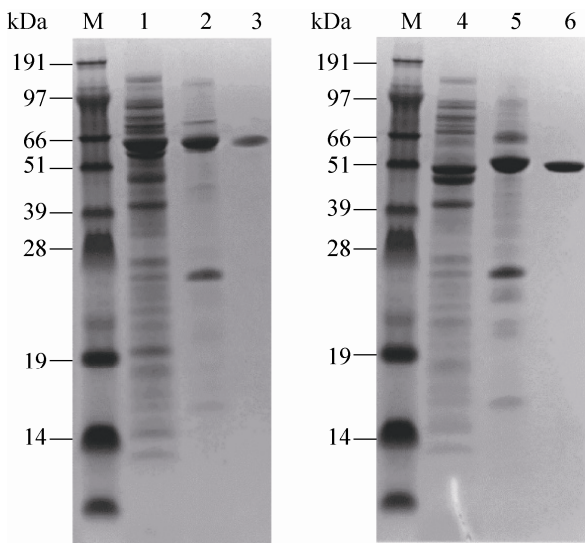


图 2. SDH 及 SNDH 纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of the purification process of the dehydrogenases. M: Standard protein marker; 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-sdh; 2: SDH purified by Ni-NTA; 3: SDH purified by gel filtration chromatography. 4: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-sndh; 5: SNDH purified by Ni-NTA; 6: SNDH purified by gel filtration chromatography.

2.3 SDH 及 SNDH 的酶学性质分析

对纯化后的蛋白进行最适反应 pH 值、最适反应温度的分析。以 pH 7.0 的 PBS 作为酶活反应的缓冲液，分别测定 SDH 和 SNDH 于 20–45 °C 反应温度下的酶活，计 30 °C 的相对酶活为 100%。结果显示 SDH 的最适反应温度为 30 °C，且 25 °C 和 35 °C 的酶活与 30 °C 的酶活基本一致；SNDH 的最适反应温度为 35 °C (图 3-A)。

于 30 °C 的条件下进行酶活测定，比较 SDH 和 SNDH 于 pH 3.0–10.0 环境中的酶活力，计 pH 7.0 时的相对酶活为 100%。结果显示 SDH 于 pH 8.0 时呈现最高的相对酶活，SNDH 在 pH 8.0 和

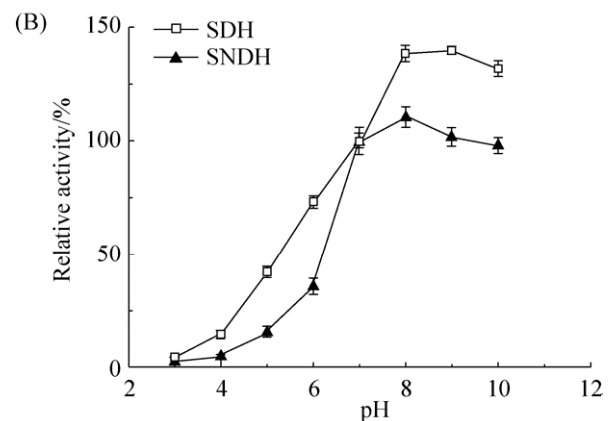
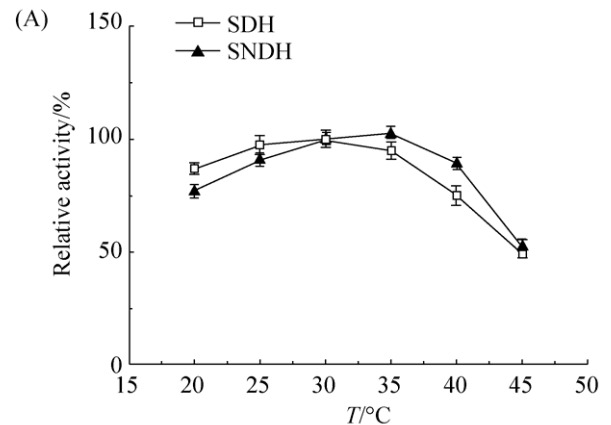


图 3. 温度及 pH 对脱氢酶活性的影响

Figure 3. Effects of temperature and pH on enzyme activity. A: Effects of temperature on SDH and SNDH activity; B: Effects of pH on SDH and SNDH activity.

pH 9.0 时相对酶活接近且最高。两种脱氢酶在 pH 较低时, 相对活性都很低(图 3-B)。

2.4 SDH 及 SNDH 的酶活测定及动力学参数的测定

SDH 的酶活测定条件为 pH 8.0, 温度为 30 °C, 参照 1.2.4 中酶活测定方法, 测得 SDH 的比酶活为 3.15 U/mg; 同样的, SNDH 的酶活测定条件为 pH 8.0, 温度为 35 °C, 测得 SNDH 的比酶活为 6.12 U/mg。

为了确定关键酶的动力学参数, 分别测定了 SDH 和 SNDH 在 25、50、100、150、250 mmol/L 底物浓度下的催化活性, 进行数据拟合和米氏方程进行数据分析, 得到 SDH 的 K_m 为 149.52 mmol/L; SNDH 的 K_m 为 94.68 mmol/L (图 4)。

2.5 SDH 及 SNDH 体外催化特性分析

对 SDH、SNDH 组合催化 L-山梨糖反应体系进行 HPLC 验证, 结果 SDH、SNDH 可组合催化 L-山梨糖生成 2-KLG, 并且检测到中间产物 L-山梨酮(图 5)。

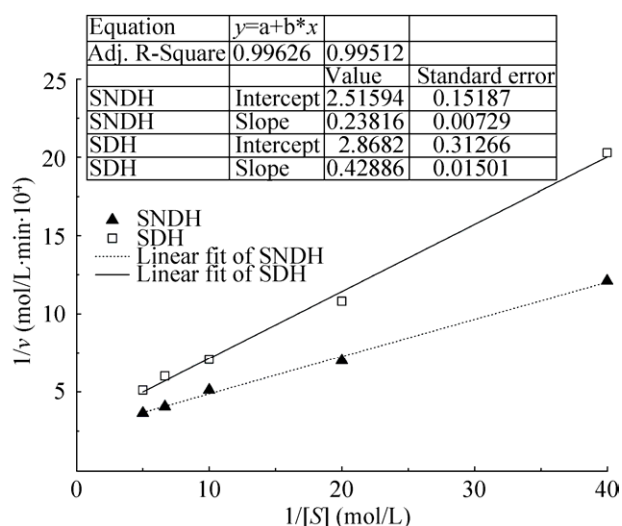


图 4. 反应动力学的米氏方程

Figure 4. Michaelis-Menten plots for the reaction kinetics.

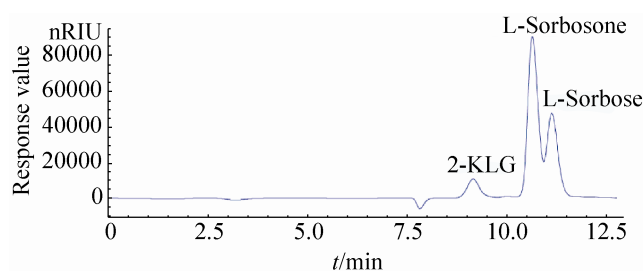


图 5. 催化 L-山梨糖生成 2-KLG 的 HPLC 检测

Figure 5. Analysis of 2-KLG production from L-sorbose by HPLC.

3 讨论

目前国内发酵生产维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸采用的方法为二步发酵法^[23]。其中, 负责 L-山梨糖向 2-KLG 转化的山梨糖脱氢酶(SDH)和山梨酮脱氢酶(SNDH)是该途径中的关键酶。因此, 将源于混菌系统的 SDH 和 SNDH 异源表达于氧化葡萄糖酸杆菌, 理论上可获得 2-KLG 生产一步菌。为了实现这一目的, Akira 等对一种 *G. oxydans* DSM 4025 来源的山梨糖/山梨醇脱氢酶的酶学性质进行分析, 发现该酶最适反应 pH 值为 7.5–8.5, 最适反应温度为 30–40 °C^[22]。Zhang 等对 *G. oxydans* GO112 中的 SDH 进行纯化和分析发现, pH 6.86、40 °C 时, SDH 活性最高^[24]。Taro 等发现源于 *K. vulgare* DSM 4025 的 SNDH 在 pH 7.0 时可将 L-山梨酮转化为 L-AA^[25]。

本文将源于 *K. vulgare* WSH-001 的 *sdh* 和 *sndh* 基因异源表达于大肠杆菌中, 通过 Ni-NTA 亲和层析柱(QIAGEN)和凝胶过滤层析得到了较高纯度的 SDH 和 SNDH, 利用显色法测得 SDH 的酶活为 3.15 U/mg, 并测得 SDH 的最适反应温度为 30 °C, 最适反应 pH 为 8.0 左右; 同样的, SNDH 的酶活为 6.12 U/mg, 并测得 SNDH 的最适反应温度为 35 °C, 最适反应 pH 为 8.0 左右。在 pH 3.0、

4.0、5.0 的偏酸性条件下，2 个酶的酶活都很低。本实验室的 Gao 等将源于 *K. vulgare* WSH-001 的 *sdh* 和 *sndh* 基因通过质粒异源表达于 *G. oxydans* WSH-003，得到 2-KLG 最高产量为 4.9 g/L，通过连接肽将 SDH 和 SNDH 融合表达后，2-KLG 产量进一步提高为 32.4 g/L，尽管如此，发酵液中仍然有大量 L-山梨酮积累^[12]且发酵过程中 pH 值自然下降为 4.0 左右^[26]，因此，基于本实验获得的研究结果，可设计 pH 调控策略优化 Gao 等构建的 *G. oxydans* WSH-003 2-KLG 生产一步菌。通过调控发酵后期反应体系的 pH 及温度，使得表达在 *G. oxydans* WSH-003 中的 SDH、SNDH 具有最大的催化活性。*K. vulgare* WSH-001 来源的 SDH 和 SNDH 的酶学性质研究，将会为 2-KLG 生产一步菌的应用提供借鉴意义。

参考文献

- [1] Zhang J, Liu J, Shi ZP, Liu LM, Chen J. Manipulation of *B. megaterium* growth for efficient 2-KLG production by *K. vulgare*. *Process Biochemistry*, 2010, 45(4): 602–606.
- [2] Jacob RA, Sotoudeh G. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in Clinical Care*, 2002, 5(2): 66–74.
- [3] Zhu YB, Liu J, Du GC, Zhou JW, Chen J. Sporulation and spore stability of *Bacillus megaterium* enhance *Ketogulonigenium vulgare* propagation and 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 399–404.
- [4] Bremus C, Herrmann U, Bringer-Meyer S, Sahn H. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124(1): 196–205.
- [5] Hancock RD, Viola R. Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(7): 299–305.
- [6] Hancock RD, Viola R. The use of micro-organisms for L-ascorbic acid production: current status and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(5/6): 567–576.
- [7] Wang XB, Liu J, Du GC, Zhou JW, Chen J. Efficient production of L-sorbose from D-sorbitol by whole cell immobilization of *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 77: 171–176.
- [8] Urbance JW, Bratina BJ, Stoddard SF, Schmidt TM. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(3): 1059–1070.
- [9] Asakura A, Hoshino T. Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63(1): 46–53.
- [10] Liu LM, Li Y, Zhang J, Zhou ZM, Liu J, Li XM, Zhou JW, Du GC, Wang L, Chen J. Complete genome sequence of the industrial strain *Ketogulonigenium vulgare* WSH-001. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(21): 6108–6109.
- [11] Gao LL, Du GC, Zhou JW, Chen J, Liu J. Characterization of a group of pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases that are involved in the conversion of L-Sorbose to 2-Keto-L-gulonic acid in *Ketogulonigenium vulgare* WSH-001. *Biotechnology Progress*, 2013, 29(6): 1398–1404.
- [12] Gao LL, Hu YD, Liu J, Du GC, Zhou JW, Chen J. Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 30–37.
- [13] Xu A, Yao J, Yu L, Lv S, Wang J, Yan B, Yu Z. Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(6): 1317–1323.
- [14] Wei DZ, Yuan WK, Yin GL, Yuan ZY, Chen MH. Studies on kinetic model of vitamin C two-step fermentation process. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1992, 8(3): 277–282. (in Chinese)
魏东芝, 袁渭康, 尹光琳, 袁中一, 陈敏恒. 维生素 C 二步发酵过程动力学模型的研究. *生物工程学报*, 1992, 8(3): 277–283.
- [15] Xue ZY, Yin GL. Study on the purification of L-sorbose dehydrogenase and its physical chemical and enzyme properties. *Microbiology*, 2000, 27(2): 89–92. (in Chinese)
薛震役, 尹光琳. L-山梨糖脱氢酶的纯化及性质的研究. *微*

- 生物学通报, 2000, 27(2): 89–92.
- [16] Hao AY, Jia Q, Wu HT, Zhou HR, Geng WF, Gao WL, Zhao JQ, Jia JG. Isolation and characteristics research of L-sorbose dehydrogenase in *Ketogulonigenium* sp. WB0104. *Industrial Microbiology*, 2008, 38(1): 10–14. (in Chinese)
郝爱鱼, 贾茜, 吴洪涛, 周华芮, 耿文飞, 高文利, 赵军强, 贺建功. 酮古龙酸菌 WB0104 中 L-山梨糖脱氢酶的分选和性质研究. *工业微生物*, 2008, 38(1): 10–14.
- [17] Araki T, Nakatsuka T, Kobayashi F, Watanabe-Ishimaru E, Sanada H, Tamura T, Inagaki K. Reactivity of sorbose dehydrogenase from *Sinorhizobium* sp. 97507 for 1,5-anhydro-d-glucitol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(7): 1130–1132.
- [18] Zhao SG, Yao LM, Su CX, Wang T, Wang J, Tang ML, Yu ZL. Purification and properties of a new L-sorbose dehydrogenase accelerative protein from bacillus megaterium bred by ion-beam implantation. *Plasma Science and Technology*, 2008, 10(3): 398–402.
- [19] Gao SY, Zhang WC, Wang JH, Guo AG. Integration and expression of *sdh* gene in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(1): 139–141. (in Chinese)
高书颖, 张惟材, 汪建华, 郭蔼光. 山梨糖脱氢酶基因在大肠杆菌染色体上整合及表达. *微生物学报*, 2005, 45(1): 139–141.
- [20] Zhang GQ, Chen WW, Xiong XH, Wang JH, You S, Zhang WC. Prokaryotic expression and enzyme activity identification of L-sorbose dehydrogenase of *Ketogulonigenium vulgare*. *Letters in Biotechnology*, 2012, 23(4): 511–514. (in Chinese)
张谷青, 陈微微, 熊向华, 汪建华, 游松, 张惟材. 酮古龙酸菌山梨酮脱氢酶的原核表达及活性鉴定. *生物技术通报*, 2012, 23(4): 511–514.
- [21] Wang PP, Xia Y, Li JH, Kang Z, Zhou JW, Chen J. Overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes affects L-sorbose production in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 112: 70–77.
- [22] Hoshino T, Sugisawa T, Fujiwara A. Isolation and characterization of NAD(P)-dependent L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(3): 665–670.
- [23] Huang WS, Zhang R. Microbial fermentation of vitamin C. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2004, 41(S): 38–39. (in Chinese)
黄文书, 张瑞. 维生素 C 生物发酵. *新疆农业科学*, 2004, 41(S): 38–39.
- [24] Zhang W, Yan B, Wang J, Yao J, Yu Z. Purification and characterization of membrane-bound L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* GO112. *Enzyme and microbial technology*, 2006, 38(5): 643–648.
- [25] Miyazaki T, Sugisawa T, Hoshino T. Pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases from *Ketogulonicigenium vulgare* catalyze the direct conversion of L-sorbose to L-ascorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1487–1495.
- [26] Yang YH, Lü YK, Chen JM, Zhou JW. Bioprocess optimization for the production of 2-keto-L-gulonic acid by a one-step fermentation strain. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(7): 60–64. (in Chinese)
杨燕花, 吕永坤, 陈吉铭, 周景文. 2-酮基-L-古龙酸一步发酵生产菌株发酵过程优化. *食品与发酵工业*, 2016, 42(7): 60–64.

Purification and characterization of L-sorbose dehydrogenase and L-sorbose dehydrogenase from *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001

Yuan Gao, Weizhu Zeng, Jingwen Zhou, Jian Chen*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We purified and characterized L-sorbose dehydrogenase and L-sorbose dehydrogenase from *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001. [Methods] L-sorbose dehydrogenase gene (*sdh*) and L-sorbose dehydrogenase gene (*sndh*) from *K. vulgare* WSH-001 were amplified by PCR. The amplified fragments were inserted into pET-28a(+) to obtain expression plasmids, namely pET28a-*sdh* and pET28a-*sndh*. *Escherichia coli* BL21(DE3) harboring the above plasmids was used to express SDH and SNDH. Purified SDH and SNDH were obtained by using HisTrap™ affinity chromatography and gel filtration chromatography. [Results] SDH and SNDH from *K. vulgare* WSH-001 were expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified. The molecular weight of SDH and SNDH were 64 kDa and 48 kDa on SDS-PAGE, respectively. Colorimetric assay showed that the enzyme activity of SDH and SNDH was 3.15 U/mg and 6.12 U/mg, respectively. The optimum temperature and pH of the purified SDH were 30 °C and 8.0, respectively, whereas the optimum temperature and pH of the purified SNDH were 35 °C and 8.0, respectively. The enzyme activity of SDH and SNDH was extremely low at pH 3.0, 4.0 and 5.0. [Conclusion] SDH and SNDH from *K. vulgare* WSH-001 were expressed in *E. coli* BL21(DE3) and characterized. The results could provide essential reference for the achievement of one-step fermentation of 2-KLG.

Keywords: *Gluconobacter oxydans*, 2-keto-L-gulonic acid, L-sorbose dehydrogenase, L-sorbose dehydrogenase

(本文责编: 李磊)

Supported by National Basic Research Program of China (2014CB745100), by the Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of PR China (FANEDD, 201256), by the National Natural Science Foundation of China (21390204) and by the Science and Technology Support Program of Jiangsu Province (BE2014698)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85913661; Fax: +86-510-85913661; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

Received: 25 November 2016; Revised: 9 February 2017