



УДК 577.15.07

ОЧИСТКА, СВОЙСТВА И ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА
ПРОПАНДИОЛДЕГИДРАТАЗЫ ИЗ *AEROBACTER AEROGENES*Познанская А. А., Танизава К., Торайя Т.,
Сода К., Фукуи С.Всесоюзный научно-исследовательский
витаминовый институт, МоскваИнститут химических исследований и Факультет
сельскохозяйственной химии Университета Киото, Япония

Разработан новый метод очистки пропандиолдегидратазы из бесклеточных экстрактов *Aerobacter aerogenes* (АТСС 8724), который позволяет получать гомогенный фермент в препаративных количествах с удельной активностью 80—100 ед/мг белка. Метод включает обработку экстрактов протаминсульфатом, фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, хроматографию на DEAE-целлюлозе и гидроксиапатите, гель-фильтрацию через сефарозу 6В и рехроматографию на DEAE-целлюлозе. Очистку проводили в присутствии пропандиола и глицерина для защиты фермента от инактивации. Пропандиолдегидратаза имеет M 230 000, $s_{20}^{\circ, w} = 8,92$ S, $E_{1\text{см}}^{1\%} = 5,27$. При хроматографии на DEAE-сефадексе в отсутствие пропандиола и глицерина фермент диссоциирует на два белковых компонента (нейтральный F и кислый S). Инкубация смеси компонентов F и S в присутствии субстрата приводит к образованию каталитически активной формы фермента, которая при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле дает одну белковую зону. По данным определения методом гель-фильтрации молекулярный вес компонента F равен 30 000, а компонента S — 200 000. Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия установлено, что компонент S состоит из четырех неидентичных субъединиц. Определены N- и C-концевые группы пропандиолдегидратазы.

Пропандиолдегидратаза (пропандиол-гидро-лиаза, КФ 4.2.1.28) из *Aerobacter aerogenes*, штамм АТСС 8724, является одним из V_{12} -зависимых ферментов, активный центр которого построен с участием кобамидного кофермента — Со α - α -(5,6-диметилбензимидазол)-Со β -аденозилкобамида (AdoCbl). В последние годы пропандиолдегидратаза интенсивно изучается в плане исследования механизма действия AdoCbl [1, 2]. Для очистки фермента из бесклеточных экстрактов *A. aerogenes* используется метод [3], с помощью которого он может быть получен в близком к гомогенному состоянию с удельной активностью 40 ед/мг белка. Этот метод включает многократные переосаждения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, не содержит высокоэффективных способов очистки, обычно применяемых в энзимологии, и плохо воспроизводим. Как показали исследования японских авторов [4], трудности в очистке пропандиолдегидратазы заключаются в том, что фермент состоит из двух, по-видимому непрочно связанных друг с другом, компонентов (S и F), один из которых, F, быстро инактивируется.

Нами были найдены условия, позволяющие в большей степени избежать диссоциации пропандиолдегидратазы на ее компоненты. Это дало

Очистка пропандиолдегидратазы

Стадии очистки	Белок, мг	Актив- ность, ед.	Удельная актив- ность, ед/мг белка	Выход. %
Исходный бесклеточный экстракт	35 900	41 600	1,16	100
Обработка протаминсульфатом	22 200	29 300	1,32	71
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 700	17 800	2,63	43
Хроматография на DEAE-целлюлозе	2 299	12 400	5,39	30
Хроматография на гидроксилпатите	448	5 408	12,07	13
Гель-фильтрация через сефарозу 6В	277	4 576	16,54	11
Рехроматография на DEAE-целлюлозе	38,2	2 912	76,28	7

возможность разработать новый метод очистки этого фермента с использованием хроматографических методов. Описываемый метод позволяет получать гомогенные препараты в препаративных количествах с высокой удельной активностью. В настоящем сообщении излагаются также некоторые свойства пропандиолдегидратазы и особенности ее структуры.

Пропандиолдегидратаза является адаптивным ферментом и синтезируется в клетках *A. aerogenes* при выращивании их на среде, содержащей субстрат (1,2-пропандиол) в качестве индуктора. При определенных условиях ферментации (см. раздел «Экспериментальная часть») выход клеток с 1 л среды составляет 1—1,5 г. Для препаративного выделения и очистки фермента использовали 800—1200 г сырой биомассы. Клетки разрушали путем механического разрушения стеклянными бусинками, используя прибор Дупо-Mill (ФРГ); разрушение клеток ультразвуком давало худшие результаты (более низкие величины общей активности фермента). В суспензию разрушенных клеток сразу добавляли 1,2-пропандиол (2% для стабилизации фермента) и активированный уголь (для сорбции эндогенных корриноидов, вызывающих его инактивацию). После центрифугирования суспензии получали бесклеточный экстракт, в котором удельная активность пропандиолдегидратазы обычно составляла 1—1,2 ед/мг белка (таблица). Осаждение нуклеиновых кислот из бесклеточного экстракта проводили протаминсульфатом при постоянном перемешивании смеси и контролируя pH среды (8,0); в отдельных опытах протаминсульфат заменяли стрептомицином с одинаковой эффективностью. После удаления нуклеиновых кислот фермент осаждали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при насыщении до 55%. На этой стадии очистки наблюдается значительная потеря общей активности фермента, что, по-видимому, связано с его диссоциацией на компоненты и инактивацией нестабильного компонента F. Было найдено, что в присутствии высоких концентраций глицерина и 1,2-пропандиола (10 и 5% соответственно) фермент стабилизируется. В результате удается провести хроматографию на DEAE-целлюлозе, что вызывает 2-кратное повышение удельной активности пропандиолдегидратазы с незначительной потерей ее общей активности на этой стадии. С колонки из DEAE-целлюлозы активные фракции элюируются 0,11 М KCl. При хроматографии на гидроксилпатите для стабилизации фермента также использовали буфер, содержащий 2% пропандиола. Снижение выхода активной пропандиолдегидратазы на этой стадии очистки с 30 до 13% обусловлено не столько инактивацией фермента в процессе хроматографии, сколько потерей его активности при концентрировании препарата фермента ультрафильтрацией, которую проводили перед нанесением фермента на колонку из гидроксилпатита.

Профиль элюции белковых фракций при гель-фильтрации через сефарозу 6В, распределение удельной активности пропандиолдегидратазы, а также результат проверки гомогенности наиболее активных фракций методом аналитического электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 1) свидетельствуют о том, что в активных фракциях присутствует белковая примесь, которая дает дополнительную (минорную) полосу помимо

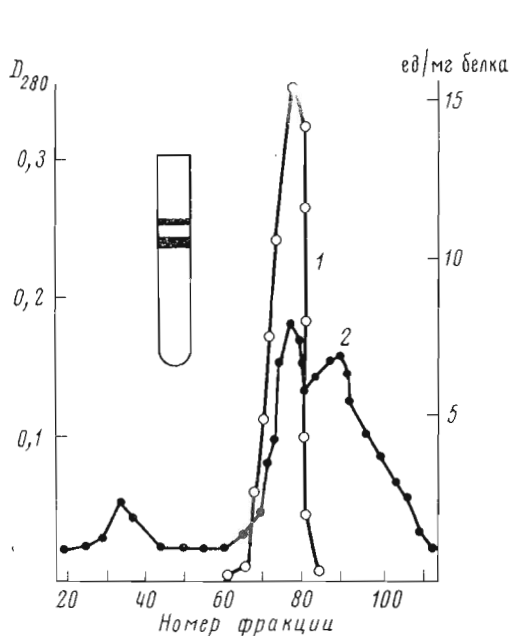


Рис. 1

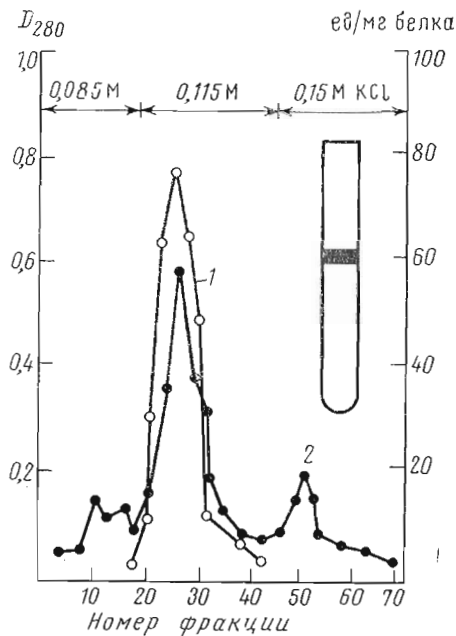


Рис. 2

Рис. 1. Гель-фильтрация пропандиолдегидратазы через сефарозу 6В (объем каждой фракции 10 мл) и электрофорез в полиакриламидном геле: 1 — поглощение при 280 нм; 2 — удельная активность

Рис. 2. Рехроматография препарата пропандиолдегидратазы на DEAE-целлюлозе (объем каждой фракции 5 мл) и электрофорез в полиакриламидном геле: 1 — поглощение при 280 нм; 2 — удельная активность

основной зоны. После рехроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой был получен препарат с удельной активностью 76,28 ед/мг белка и с выходом по активности 7%. Гомогенность препарата была подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле (одна четкая зона, рис. 2), а также методом аналитического ультрацентрифугирования (рис. 3): на седиментационных диаграммах виден один симметричный пик.

Описываемый метод очистки пропандиолдегидратазы хорошо воспроизводится и позволяет получать препараты фермента, обладающие активностью 100 ед/мг белка, что в 2—2,5 раза превышает активность препаратов, полученных другими методами [3]. Кроме того, предлагаемый метод дает возможность получать гомогенную пропандиолдегидратазу в препаративных количествах. Попытки упростить очистку фермента, минуя стадии хроматографии на гидроксилалатите или гель-фильтрации через сефарозу 6В, оказались безуспешными, так как не приводили к получению гомогенных препаратов.

Препараты пропандиолдегидратазы сохраняют свою активность в течение 1—1,5 месяцев при -20° в присутствии 10% глицерина и 5% пропандиола.

По данным японских авторов [4], хроматография неочищенных препаратов фермента на колонке из DEAE-целлюлозы в отсутствие субстрата приводит к его диссоциации на два белковых компонента — F и S.

Для получения гомогенных препаратов F и S с целью изучения некоторых их свойств и структуры использовали 10 мг очищенной пропандиолдегидратазы. Результаты разделения фермента на компоненты с помощью хроматографии на колонке из DEAE-сефадекса А-50 (препарат не содержал пропандиола и хроматографию проводили также в отсутствие

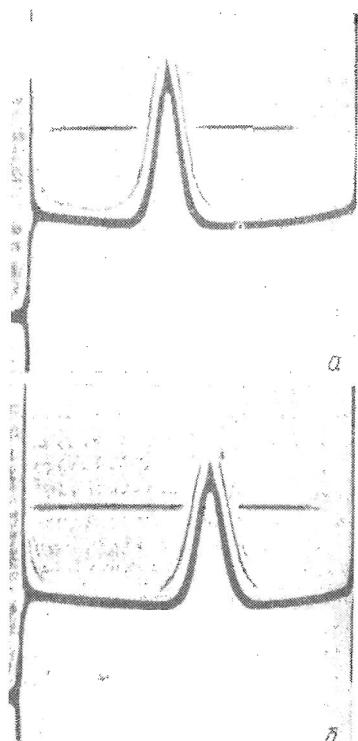


Рис. 3. Седиментационная диаграмма очищенной пропандиолдегидратазы через 44 мин (а) и 56 мин (б) после достижения полной скорости. Концентрация фермента 6,18 мг/мл, скорость вращения ротора 59 780 об/мин

На рис. 6 представлены спектры поглощения образованного комплекса и компонентов S и F. Обращает на себя внимание тот факт, что в отличие от комплекса и компонента S с типичным для белков максимумом поглощения при 278—280 нм компонент F имеет необычный спектр: два небольших максимума при 260 и 270 нм и отсутствие максимума при 280 нм. Для комплекса пропандиолдегидратазы и компонентов F и S при 280 нм были определены коэффициенты экстинкции ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$), равные соответственно 5,27; 3,06 и 7,34. Низкая величина коэффициента экстинкции у компонента F указывает на отсутствие или очень незначительное количество ароматических аминокислот в его молекуле.

Молекулярный вес комплекса пропандиолдегидратазы и его компонента S определяли методом гель-фильтрации через сефадекс G-200 (рис. 7); кроме того, молекулярный вес комплекса (M 230 000 \pm 10 000) рассчитывали на основании седиментационных данных по методу [5], учитывая, что фермент имеет $s_{20, w} = 8,92$ S и парциальный удельный объем 0,74. По данным гель-фильтрации, молекулярный вес комплекса равен также 230 000, а молекулярный вес компонента S — 200 000. Исходя из этих данных, молекулярный вес компонента F равен 30 000. Таким образом, молекула пропандиолдегидратазы представляет собой комплекс двух белковых компонентов, значительно отличающихся друг от друга по целому ряду физико-химических свойств (молекулярный вес, спектр поглощения, содержание ароматических аминокислот и т. д.).

Свойства компонента S при электрофорезе в отсутствие субстрата (рис. 5) и его большой молекулярный вес давали основание предполагать,

субстрата) показывают, что в описанных условиях фермент диссоциирует на два компонента, один из которых (F) не связывается с ионообменником и элюируется с колонки тем же буфером, которым был уравновешен DEAE-сефадекс, а второй (S) элюируется 0,15 M KCl (рис. 4). Компонент F не связывается и с CM-целлюлозой, что свидетельствует о его нейтральных свойствах; он крайне лабилен, но сохраняется в течение нескольких дней при 0° в 20% глицерине. Каждый компонент в отдельности не обладает ферментативной активностью, и активной формой пропандиолдегидратазы является комплекс F·S, для образования которого необходимо присутствие в среде субстрата. Данные электрофореза в полиакриламидном геле отдельных компонентов в отсутствие и присутствии субстрата (компонент F не удается обнаружить обычным методом идентификации белковых зон при электрофорезе: он не окрашивался ни амидочерным, ни кумасси голубым) показывают, что в отсутствие субстрата компонент S диссоциирует по крайней мере на четыре белковых компонента и ассоциация компонента F и S в комплекс F·S в отсутствие 1,2-пропандиола не происходит. Однако при добавлении субстрата происходит сборка белковых компонентов в одну молекулу пропандиолдегидратазы, о чем свидетельствует наличие в геле одной четкой белковой зоны (рис. 5).

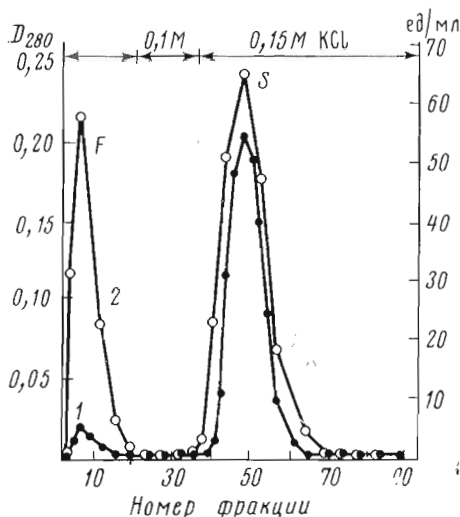


Рис. 4

Рис. 4. Хроматографическое разделение пропандиолдегидратазы на компоненты F и S на DEAE-сефадексе А-50 в отсутствие субстрата (объем фракций 5 мл): 1 — поглощение при 280 нм; 2 — активность при объединении фракций F и S в отношении 1 : 1 и добавлении субстрата

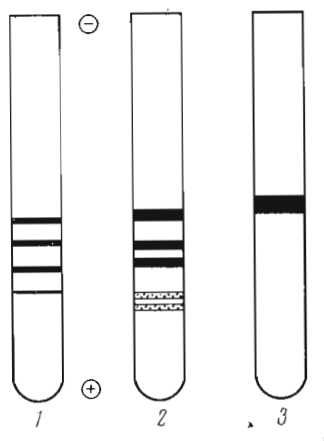


Рис. 5

Рис. 5. Образование пропандиолдегидратазы из компонентов F и S, по данным электрофореза в полиакриламидном геле: 1 — компонент S (без субстрата); 2 — компоненты F и S (без субстрата); 3 — образование пропандиолдегидратазы из ее компонентов в присутствии субстрата

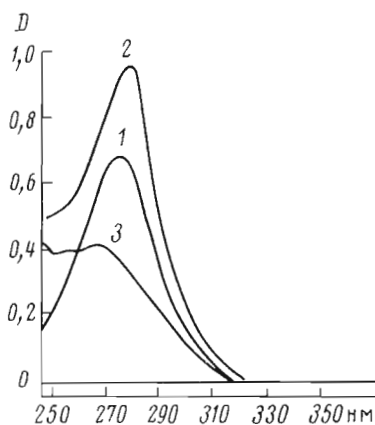


Рис. 6

Рис. 6. Спектры поглощения пропандиолдегидратазы (1), компонента S (2) и F (3)

что этот белок состоит из субъединиц. Для выяснения этого компонент S обрабатывали додецилсульфатом натрия и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия. Полученные результаты, представленные на рис. 8, показывают, что компонент S состоит из четырех субъединиц, обозначенных как S₁, S₂, S₃ и S₄. Молекулярные веса субъединиц были определены электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии Na-додецилсульфата (рис. 7); их величины равны: S₁ — 60 000; S₂ — 23 000; S₃ — 15 500 и S₄ — 14 000 (рис. 7). Общий молекулярный вес этих субъединиц составляет 112 500. Поскольку молекулярный вес исходного компонента S равен 200 000, можно предполагать, что его молекула состоит из четырех пар неравных по молекулярному весу субъединиц.

При определении N- и C-концевых аминокислот пропандиолдегидратазы было показано, что S-концевыми аминокислотами фермента являются лейцин, гистидин, аспарагиновая кислота (или аспарагин) и глутаминовая кислота (или глутамин), а N-концевыми — лизин, цистеин, метионин и лейцин. Помимо этих N-концевых аминокислот на хромато-

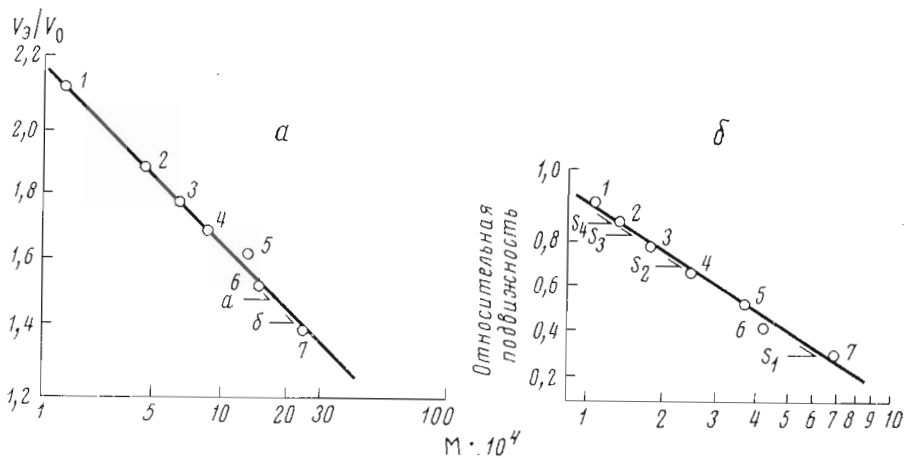


Рис. 7

Рис. 7. Молекулярный вес пропандиолдегидратазы и компонента S, по данным гель-фильтрации через сефадекс G-200 (а), и молекулярные веса субъединиц компонента S, по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (б). а — Маркеры: 1 — цитохром с, 2 — яичный альбумин, 3 — трансаминиаза D-аминокислот, 4 — кинурениназа, 5 — бычий сывороточный альбумин, 6 — алкогольдегидрогеназа, 7 — каталаза. Стрелками обозначены молекулярные веса компонента S (а) и пропандиолдегидратазы (б). б — Маркеры: 1 — цитохром с, 2 — лизоцим, 3 — миоглобин, 4 — трипсин, 5 — лактатдегидрогеназа, 6 — яичный альбумин, 7 — бычий сывороточный альбумин. Стрелками обозначены молекулярные веса, соответствующие субъединицам S₁, S₂, S₃ и S₄.

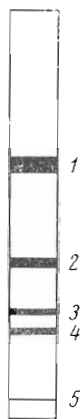


Рис. 8

Рис. 8. Электрофорез компонента S в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия: зоны 1, 2, 3 и 4 соответствуют субъединицам S₁, S₂, S₃ и S₄; 5 — бромфенол синий

графических полиамидных пластинках были обнаружены также два слабофлуоресцирующих пятна дансил-производных фенилаланина и изолейцина.

Таким образом, получение препаративных количеств гомогенной пропандиолдегидратазы позволило установить сложную субъединичную структуру этого фермента и важную роль субстрата в ассоциации ее структурных компонентов. Дальнейшее изучение четвертичной структуры фермента, условий ассоциации и диссоциации субъединиц и влияние на эти процессы лигандов (субстрата, кофермента, иона K, являющегося кофактором) представляет большой интерес в плане изучения механизма действия В₁₂-зависимых ферментов.

Экспериментальная часть

Клетки *Aerobacter aerogenes* ATCC 8724 выращивали на среде, содержащей 0,5% KН₂РO₄, 0,12% (NH₄)₂SO₄, 0,04% MgSO₄ · 7H₂O, 0,2% дрожжевого экстракта, 0,9% глицерина и 0,5% 1,2-пропандиола; pH среды доводили до 7,2, используя твердую КОН. Ферментацию проводили в 100-литровом ферментере при 37° в течение 18—20 ч в статических условиях без аэрации и перемешивания.

Клетки отделяли от среды центрифугированием, промывали дважды 0,5 М К-фосфатным буфером (pH 8,0) и хранили при -20°. Всю очистку фермента проводили при 0—5°. Отмытые клетки суспендировали в 0,05 М

К-фосфатном буфере, рН 8,0 (20—25% суспензия), устанавливали рН 8,6—8,7 добавлением 10% KOH и разрушали с помощью прибора Dupo-Mill (ФРГ). Сразу же к суспензии разрушенных клеток добавляли активированный уголь (0,2 г на 1 г сырых клеток) и 1,2-пропандиол (конечная концентрация 2%), после чего суспензию центрифугировали 30 мин при 11 000 об/мин для получения бесклеточного экстракта. К бесклеточному экстракту постепенно при энергичном перемешивании добавляли протаминсульфат (60 мл 2% протаминсульфата на каждые 100 мг бесклеточного экстракта) для осаждения нуклеиновых кислот, следя все время за величиной рН (8,0—8,2). Смесь оставляли на холоду в течение 10 мин, после чего центрифугировали 40 мин при 11 000 об/мин. Осадок отбрасывали, а к надосадочной жидкости добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 55% насыщения. Образовавшийся осадок собирали центрифугированием, растворяли в минимальном объеме 0,01 М К-фосфатного буфера (рН 8,0), содержащего 10% глицерина, 5% 1,2-пропандиола и 0,01% меркаптоэтанола, и раствор диализовали 24 ч против такого же буфера.

После диализа ферментный препарат наносили на колонку из DEAE-целлюлозы (6,5 × 55 см), уравновешенную тем же буфером, против которого проводили диализ. Для элюции белков, которую вели со скоростью 20 мл/ч, использовали ступенчатый градиент KCl. Активный белок элюировался при 0,115 М концентрации KCl. Активные фракции собирали, концентрировали ультрафильтрацией и диализовали против 0,001 М K_2HPO_4 , содержащего 2% пропандиола и 0,01% меркаптоэтанола. После диализа ферментный препарат наносили на колонку из гидроксилатагита (5,5 × 45 см), уравновешенную тем же буфером, против которого диализовали препарат. Элюцию вели со скоростью 20 мл/ч, повышая ступенчато концентрацию буфера. Активный белок элюировался 0,02 М К-фосфатным буфером. Фракции, содержащие фермент, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией и наносили на колонку с сефарозой 6В (3 × 137 см), уравновешенную 0,05 М К-фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 2% 1,2-пропандиола. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 12 мл/ч. Активные фракции объединяли, концентрировали ультрафильтрацией и проводили рехроматографию на колонке из DEAE-целлюлозы в условиях, описанных выше.

Разделение пропандиолдегидратазы на ее компоненты проводили методом хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-50 (1,2 × 30 см) уравновешенной 0,01 М К-фосфатным буфером (рН 8,0) с 0,01% меркаптоэтанола, не содержащим субстрата. Перед нанесением на колонку препарат фермента диализовали против того же буфера. Элюцию проводили со скоростью 12 мл/ч, используя ступенчатый градиент KCl.

Активность пропандиолдегидратазы определяли по количеству пропионового альдегида, образующегося из 1,2-пропандиола при инкубации с ферментом в присутствии AdoCbl. 1 мл реакционной смеси содержал 10 мкмоль 1,2-пропандиола, 50 мкмоль KCl, 0,015 мкмоль AdoCbl, 40 мкмоль 0,05 М К-фосфатного буфера (рН 8,0) и препарат фермента; реакцию начинали добавлением AdoCbl. Пробы инкубировали в течение 10 мин при 37°. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 10% трихлоруксусной кислоты. Количество образовавшегося пропионового альдегида определяли колориметрическим методом с помощью 2,4-динитрофенилгидразина [6]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль альдегида за 1 мин. Удельную активность пропандиолдегидратазы выражали в единицах фермента в расчете на 1 мг белка.

Растворы белков концентрировали с помощью прибора фирмы Amicon (США) на мембранах ХМ-50. Концентрацию белков в растворе определяли спектрофотометрически при 280 нм, а также методом Лоури [7].

Спектрофотометрические измерения проводили в спектрофотометре Carl Zeiss PMQP (ФРГ).

Спектры поглощения были сняты в кювете с длиной оптического пути 1 см в регистрирующем спектрофотометре Shimazu MPS-50L (Япония).

Аналитический электрофорез проводили в 7,5% полиакрил-амидном геле с трис-глициновым электродным буфером, рН 8,3, по методу Дэвиса [8]; время электрофореза 1,5 ч при силе тока 2 мА на трубку, количество белка 30—50 мкг. В зависимости от целей исследования электрофорез проводили в присутствии или без 1,2-пропандиола.

Седиментационный анализ проводили в аналитической ультрацентрифуге Spinco (модель E, США), с регистрацией при помощи шлирен-оптики.

В опытах по изучению субъединичной структуры компонента S препарат белка (0,2—0,6 мг/мл) выдерживали в 0,05 М Na-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 1% додецилсульфат натрия и 1% меркаптоэтанол, в течение 20 ч при 37°.

Электрофорез в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия проводили по методу [9]. После электрофореза гели фиксировали в 10% трихлоруксусной кислоте и окрашивали 0,25% кумасси синим. Молекулярный вес субъединиц компонента S рассчитывали по калибровочному графику, выражающему зависимость относительной подвижности стандартных белков-маркеров от их молекулярного веса. Относительную подвижность измеряли как отношение расстояния миграции белковой полосы к расстоянию, пройденному красителем — бромфеноловым синим. В качестве белков-маркеров использовали: цитохром *c* (M 11 700), лизоцим (M 14 300), миоглобин (M 17 200), трипсин (M 23 300), лактатдегидрогеназу (M 36 000), яичный альбумин (M 43 000), бычий сывороточный альбумин (M 68 000).

Молекулярный вес пропандиолдегидратазы определяли методом гель-фильтрации [10] на колонке ($1,5 \times 90$ см) из сефадекса G-200, уравновешенного 0,05 М К-фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 0,1 М KCl, 0,1% 1,2-пропандиола и 0,01% меркаптоэтанола. В качестве стандартов использовали цитохром *c* (M 12 400), яичный альбумин (M 45 000), кинурениназу из бактерий (M 92000), каталазу (M 244000), алкогольдегидрогеназу из дрожжей (M 150 000), бычий сывороточный альбумин (димер, M 135 000), трансаминазу *D*-аминокислот (M 68 000).

N-концевые аминокислоты определяли дансильным методом [11], а C-концевые аминокислоты — по методу [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Toraya T., Kondo M., Isemura Y., Fukui S. (1972) *Biochemistry*, **11**, 2599—2606.
2. Schrauzer C. N., Michaely W. J., Holland R. J. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 2024—2026.
3. Lee H. A., Abeles R. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 2367—2373.
4. Toraya T., Uesako M., Fukui S. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3895—3899.
5. Van Holde K. E., Baldwin R. L. (1958) *J. Phys. Chem.*, **60**, 734—740.
6. Böhme H., Winkler O. (1954) *Z. analyt. Chem.*, **142**, 1—4.
7. Loury O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
8. Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.
9. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
10. Andrews F. (1964) *Biochem. J.*, **91**, 222—233.
11. Weiner A., Platt T., Weber K. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3242—3251.
12. Matsuo H., Fujimoto Y., Fatsuno T. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **22**, 69—73.

Поступила в редакцию
13.V.1976

PROPANEDIOL DEHYDRATASE FROM *AEROBACTER AEROGENES*:
PURIFICATION, ENZYMATIC PROPERTIES AND MOLECULAR STRUCTURE

POZNANSKAYA A. A., TANIZAWA K., SODA K.,
TORAYA T., FUKUI S.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow;
Institute for Chemical Research and Department of Industrial
Chemistry, Kyoto University, Japan*

A new method for the purification of propanediol dehydratase (PDD; EC 4.2.1.28) from the cell-free extracts of *Aerobacter aerogenes* (ATCC 8724) has been developed, which gives the opportunity to obtain in a large scale a homogeneous PDD with the specific activity of 80—100 units/mg protein. The purification procedure consists of treatment with protamine sulfate, ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose and hydroxyapatite column chromatography, Sepharose 6B gel filtration and second DEAE-cellulose chromatography. The entire procedure is carried on in the presence of propanediol and glycerol to protect the enzyme from inactivation. The molecular weight of the enzyme is 230 000; $s_{20,w} = 8.92S$; $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 5.27$. PDD dissociates into two protein components (a neutral protein F and an acid protein S) when it is chromatographed on a DEAE-Sephadex column in the absence of propanediol and glycerol. The catalytically active PDD is formed when the mixture of F and S components is incubated with the substrate, 1,2-propanediol. The mol. weight of components F and S is about 30 000 and 200 000, respectively as found by the gel filtration. By means of SDS gel electrophoresis, the component S was demonstrated to consist of at least four nonidentical subunits. The N- and C-terminal residues of PDD have been determined.
