

乳酸克鲁维酵母 β -半乳糖苷酶的分 离纯化及性质研究

沈为群* 郭杰炎 李永福

(复旦大学微生物学与微生物工程系, 上海 200433)

陈惠萍

(新型发酵厂, 上海 200437)

乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)经高压破壁后的粗提液, 其 β -半乳糖苷酶(E. C. 3.2.1.23)比活力为5.56u/mg。经硫酸铵沉淀, 丙酮沉淀, PAPMA-Sephrose 4B柱层析后, 乳糖酶比活力达370u/mg, 纯化了66.2倍, SDS-PAGE鉴定为一条带, 分子量85000Da。酶作用的最适pH在6.4—6.8之间, 最适温度40℃, 50℃保温15min酶活丧失90%。以邻硝基苯- β -半乳糖苷(ONPG)为底物的米氏常数为2.78mmol/L。酶的正常水解产物半乳糖对酶活力有一定的抑制作用, 核糖强烈抑制酶活力, Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^{+} 、PCMB和NBS都能使酶活丧失。 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和还原剂巯基乙醇的存在能提高酶活力。

关键词 乳酸克鲁维酵母; β -半乳糖苷酶或乳糖酶; 蛋白纯化

β -半乳糖苷酶在乳品工业中有着广泛的应用^[1]。我国85%以上成年人缺乏内源性乳糖酶, 为乳糖不耐症者^[2]。随着我国乳品工业的发展和人民生活水平的提高, 充分发掘牛乳的营养潜力, 乳糖酶的生产与应用已成为日益迫切的课题。我们从自然界分离到一株高产半乳糖苷酶菌株——乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis* Y₁₂-1)^[3], 证明其所产乳糖酶对牛乳乳糖有良好的水解作用^[4]。由该酶制备的低乳糖牛乳供乳糖不耐症者饮用后效果十分显著^[5]。本文报道了该乳糖酶的分离、纯化及有关酶学性质。

材料和方法

(一) 菌种

乳酸克鲁维酵母Y₁₂-1菌株系复旦大学微生物系分离得到的乳糖酶高产菌

株^[3]。

(二) 培养基

1. 试管斜面培养基: 20%(w/v)去皮马铃薯煮出汁, 2%乳糖, 2%琼脂。

2. 摇瓶培养基: 4%乳糖, 2%蛋白胨, 0.2%酵母膏。250ml三角烧瓶装50ml。

(三) 培养条件

28±2℃, 振幅7cm, 110r/min往复摇床培养42h。

(四) 化学试剂

邻硝基苯酚- β -D-半乳糖苷(ONPG)(Sigma); 二硫苏糖醇(DTT)(Serva); PAPMA-Sephrose 4B(复旦大学生化系提供); DEAE-Sephacel(Pharmacia); 羟基磷灰石(HX)(中科院生物物理所试剂厂)。

本文于1992年3月10日收到。

*现在安徽合肥中国科大生物系 230026。

(五) 分析方法

1. 酶活力测定: 2mg ONPG溶于1ml 0.05mol/L pH7.0的 KH_2PO_4 -NaOH (含0.5mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.1mmol/L MnCl_2) 缓冲液为底物, 预热后加酶液适量, 40℃反应3min, 加0.15mol/L Na_2CO_3 至5ml终止反应。721分光光度计于420nm测光吸收值。以1分钟分解ONPG产生 $1\mu\text{mol}$ ONP的酶量为一个酶活力单位。

2. 蛋白含量测定: 采用Bradford法^[6]。标准蛋白为牛血清蛋白。

3. 酶纯度鉴定: 采用SDS-聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳, 按Laemmli^[7]法, 浓缩胶4%, 分离胶9%, 电极液pH8.3, 考马斯亮蓝R-250染色。

4. 分子量测定: 按文献[7]标准蛋白为: 牛血清蛋白(68000Da), 卵白蛋白(45000Da), 碳酸酐酶(30000Da), β -乳球蛋白(17500Da), 溶菌酶(14300Da)。

结果与讨论

(一) 酵母 β -半乳糖苷酶的分离纯化

1. 粗酶液的制备: 湿菌泥用0.05mol/L磷酸缓冲液(以下缓冲液均同此)配制成0.5g/ml悬液, 60MPa高压均浆4次(冰水浴冷却)。5000r/min冷冻离心30min, 取上清液。

2. 硫酸铵沉淀: 预冷上清液360ml边搅拌边加硫酸铵固体粉末至60%饱和度, 静置4h, 10000r/min冷冻离心20min, 沉淀溶于80ml缓冲液, 10倍体积缓冲液透析过夜(4℃)。

3. 丙酮沉淀: 丙酮预冷至4℃, 等体积缓慢加入4℃酶液中, 迅速冷冻离心, 8000r/min离心20min, 取沉淀真空抽干除去残余丙酮, 再溶于40ml缓冲液

中, 10000r/min离心10min, 上清液用10倍体积缓冲液透析。

4. 吸附巯基蛋白的亲合柱层析: 透析好的酶液40ml上样于同种缓冲液平衡好的PAPMA-Sepharose 4B层析柱(1.2cm×18cm), 用0.05mol/L缓冲液洗涤后再用含0.25mol/L KCl的缓冲液洗涤, 最后用含0.1mol/L巯基乙醇的缓冲液洗脱。流速0.5ml/min。

5. 羟基磷灰石(HX)柱层析: 用0.05mol/L缓冲液平衡HX层析柱(1.2cm×1.8cm), 将上述66、67、68三管酶液合并后用同种缓冲液透析(10倍体积)后上柱, 用含0.2—0.5mol/L的缓冲液400ml梯度洗脱, 流速0.5ml/min。合

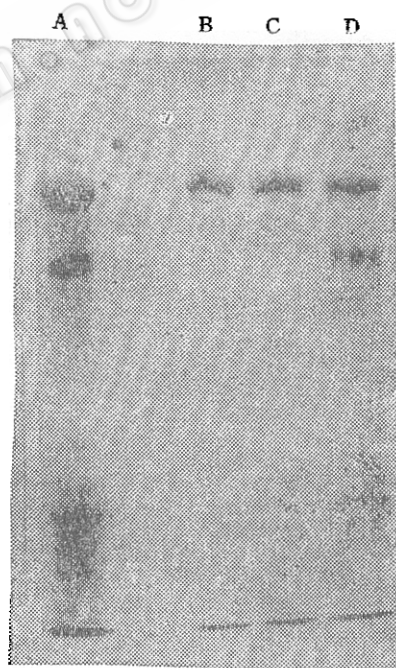


图1 纯化后样品的SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of samples from different fraction number of DEAE-sephacel chromatography
A. Acetone precipitation; B. and, C. Tube number 31 of DEAE-Sepacel chromatography; D. Samples applied to DEAE-Sepacel column

并30、31、32三管酶液。

6. DEAE-Sephacel柱层析: 上述酶液用10倍体积0.05mol/L缓冲液透析过夜(4℃)。DEAE-Sephacel柱(1.2cm×18cm)用同种缓冲液400ml平衡, 上样后用同种缓冲液洗涤至280nm无吸收值, 用含0.1—0.5mol/L KCl的缓冲液梯度洗脱, 流速为0.5ml/min, 收集31、32两

管。

7. SDS-PAGE鉴定酶纯度: 以SDS-碱性不连续胶电泳鉴定, 纯酶上样量约为40μg, 结果如图1。可见纯化后的样品只有一条带, 说明该酶只有一种亚基。

8. 纯化结果: 各步骤纯化效果见表1。

表 1 乳酸克鲁维酵母乳糖酶的分离纯化
Table 1 Purification of β -galactosidase from *K.lactis*

Step	Total volumn (ml)	Enzyme activity (u/ml)	Protein conc. (mg/ml)	Specific activity (u/mg)	Total activity (u)	Fold of purification	Yield (%)
Crude extract	360	32.0	5.75	5.56	11517.9	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	80	129.9	17.2	7.56	10389.1	1.36	90.2
Acetone precipitation	40	176.2	2.71	65.1	7049.0	11.7	61.2
PAPMA-Sephrose 4B chromatography	11	541.1	5.83	92.9	5954.8	16.7	51.7
Hydroxylapatite chromatography	10	456.1	4.13	110.4	4561.0	19.8	34.6
DEAE-Sephacel chromatography	5	289.0	0.73	368.5	1345.0	66.2	11.7

(二) 酵母 β -半乳糖苷酶的性质

1. β -半乳糖苷酶的分子量: 将纯化乳糖酶浓缩至1ml, 对缓冲液透析后取0.1ml加0.5ml蛋白处理液(含1% SDS, 5% 巯基乙醇的0.02mol/L磷酸缓冲液),

100℃水浴 3min, 标准分子量蛋白 同样处理。电泳采用Laemmli^[7]变性系统。标准曲线如图2。

从图上查得我们所提纯的乳糖酶亚基分子量为85000Da, Dickson^[8]报道*K.lactis* β -半乳糖苷酶分子量为135000Da, 两者相差较大, 这可能与菌株差异有关。

2. β -半乳糖苷酶的最适反应温度: 图3表明, 乳酸克鲁维酵母乳糖酶的最适作用温度为40℃, 50℃以上反应速度明显下降, 与前人报道相近^[15]。

3. β -半乳糖苷酶反应最适pH: 最适pH为pH6.6—pH6.8, pH>7或PH<6.4时酶活力迅速下降(图4)。

我们测定的乳糖酶最适pH低于R.C. Dickson所报道的pH7.2^[8], 而与*K.fragilis*^[10,11]和*Candida pseudotropicalis*^[12]乳糖酶相似。这个pH范围正好与牛乳的自然pH相近, 特别适用于水解

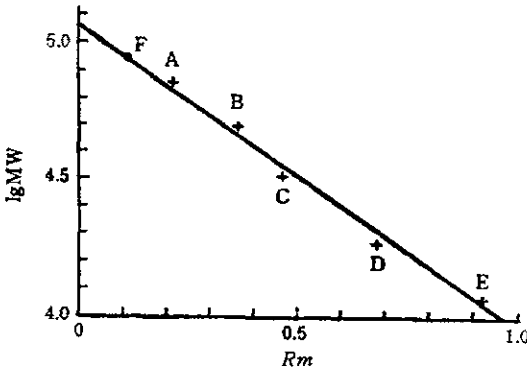


图 2 标准蛋白的分子量对数对电泳迁移率图

Fig.2 lgMW~Rm curve of protein molecular marker

A. Albumin bovin; B. Ovalbumin;
C. Carbonic anhydrase; D. β -lactoglobulin;
E. Lysozyme; F. β -galactosidase

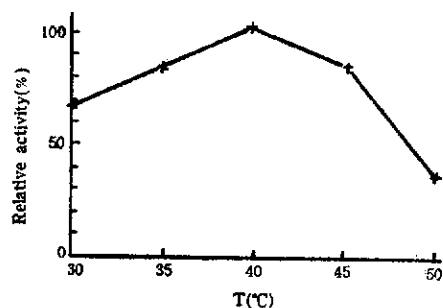


图 3 反应温度对酶活力的影响

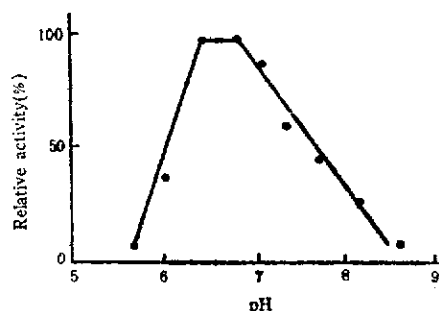
Fig.3 Effect of temperature on the activity of β -Galactosidase from *K.lactis*

图 4 反应pH对酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on the activity of β -galactosidase from *K.lactis*

牛乳。

4. β -半乳糖苷酶的热稳定性: 酵母乳糖酶是比较不耐热的, 我们测定了不同温度下分别保温15min, 60min, 120min

后乳糖酶的相对酶活力, 结果如图 5。可见35℃以上酶失活较快, 30℃保温120min后仍有92%的酶活力。在冰箱中(0—4℃)保存七天仍有80%以上的酶活力。

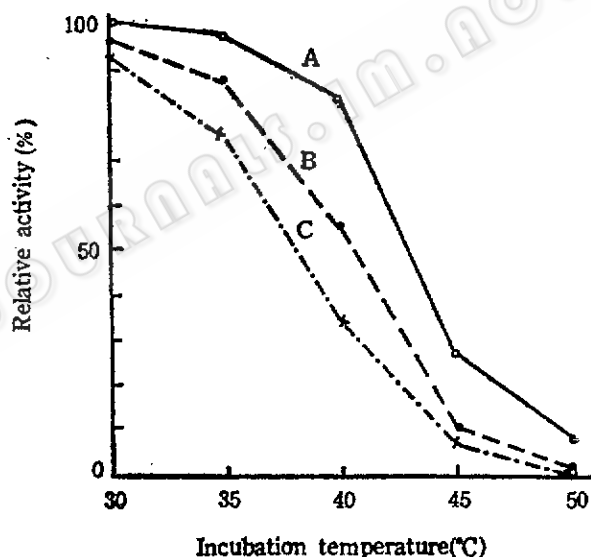


图 5 乳糖酶的热稳定性

Fig.5 Thermal stability of β -galactosidase from *K.lactis*

A. Incubating for 15min; B. Incubating for 60min; C. Incubating for 120min

5. β -半乳糖苷酶的pH稳定性: 乳糖酶在不同pH溶液中30℃放置60min, 然后调节pH至6.8, 测残留酶活力。结果(图 6)表明, 在pH6.0—pH8.2范围内酶是比较稳定的, 在此范围外, 酶迅速失活, 与文献报道的酵母乳糖酶^[15]相比,

我们实验室分离得到的乳糖酶pH稳定性范围较广。

6. β -半乳糖苷酶的最大反应速度和米氏常数: 取适量酶液与不同浓度的底物ONPG在40℃反应3min, 于420nm处测光吸收值, 以Line Weaver-Burk双倒数作

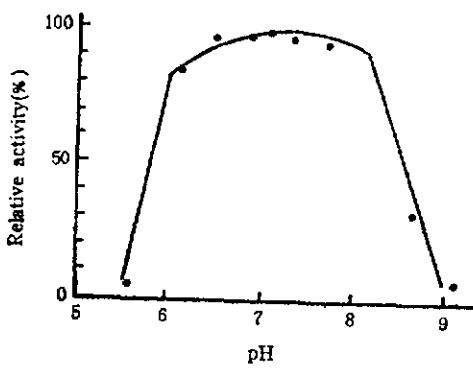


图 6 酵母乳糖酶pH稳定性

Fig.6 Effect of pH on the stability of β -galactosidase from *K.lactis*

图法得图 7。从图上可求出乳糖酶对 ONPG 的 K_m 为 2.78mmol/L, 比文献中报道的 1.6mmol/L (Robert C.Dicks-on^[8]) 和 1.78mmol/L (Ludwig^[13]) 略大些。最大反应速度为 0.1 μ mol/min。

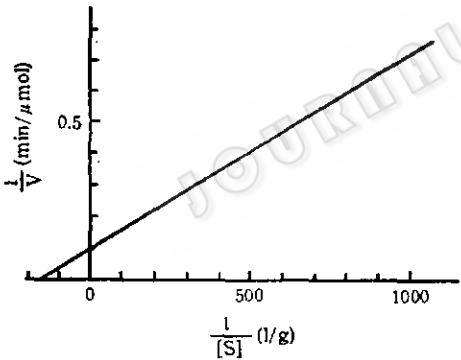


图 7 乳糖酶的Line weaver-Burk曲线

Fig.7 Lineweaver-Burk Plots of β -galactosidase on ONPG

7. 糖类对 β -半乳糖苷酶的影响: 测定了各种糖类对乳糖酶活力的影响, 酶液中各种糖类的浓度为 1.0mmol/L, 30℃ 保温30min后测酶活力。结果如表 2。

结果表明, 试验的 6 种糖对酶活力都有不同程度的抑制作用。酶的正常水解产物半乳糖比葡萄糖的抑制作用强烈, 与大多数文献报道相符^[15], 可见此酶对半乳

表 2 某些糖对乳糖酶活力的影响

Table 2 Effect of some carbohydrate on the activity of β -galactosidase

Reagents	Relative activity(%)
Glucose	91.8
Fructose	78.9
Galactose	73.6
Sucrose	95.2
Maltose	63.2
Ribose	36.0
IPTG	80.2
(None)	100

表 3 某些化合物对酶活力的影响

Table 3 Effect of some compounds on the activity of β -galactosidase

Reagents	Relative activity(%)
None	100
NBS	16.3
PCMB	17.9
EDTA	20.1
Dipyridine	93.8
NaF	89.7
PMSF	78.1
2-Mercaptoethanol	115.9
Glysin·HCl	115.5
2-Mercaptoethanol } PCMB }	27.8

表 4 金属离子对酶活力的影响

Table 4 Effect of various metal ions on the activity of β -galactosidase from *K.lactis*

Reagents	Relative activity(%)
(None)	100
NaCl	87.3
CaCl ₂	107.4
KCl	83
MnSO ₄	412
MgSO ₄	226.9
ZnSO ₄	42.3
CuSO ₄	34.9
Li ₂ SO ₄	68.9
CoCl ₂	299.5
AgNO ₃	32.5
FeSO ₄	41.1
Co ²⁺ + Mn ²⁺	321.2
Ca ²⁺ + Mn ²⁺	144.8

糖的亲合力大于葡萄糖。最值得注意的是, 核糖的抑制作用极为强烈, 尚未见有报道, 其机理值得进一步探讨。

8. 几种氨基酸修饰剂对酶活力的影响: 表3所列各种化合物在30℃与酶液一起保温30min后测酶活力, 各种化合物终浓度均为10mmol/L。由表3看出: 金属螯合剂EDTA和巯基试剂对酶活力有强烈抑制作用, 而巯基乙醇和半胱氨酸盐酸则有一定程度激活作用。说明-SH基是催化作用不可缺少的, 酶的催化还需某种金属离

子的参与。NBS也呈强烈抑制作用, NBS可氧化组氨酸, 这一结果符合Kulp^[11]假设机理。但NBS更易氧化色氨酸, 对酪氨酸、半胱氨酸也有作用, 因此, NBS的抑制作用是否因组氨酸被修饰引起的尚需进一步证实。

9. 金属离子对乳糖酶活力的影响: 金属离子与经去离子水透析后的酶液在室温下作用10min, 然后测定相对酶活力, 结果见表4。此结果与*E. coli*^[14]和*K. fragilis*^[17]乳糖酶相似。

参 考 文 献

- [1] Kulp, K., *Enzyme in Food Processing*, Academic Press, N. Y., p. 92, 1975.
- [2] 颜纪贤等, 营养学报, 9:154, 1987.
- [3] 郭杰炎等, 复旦学报(自然科学版), 29:423, 1990.
- [4] 郭杰炎等, 食品与发酵工业, 3:19, 1991.
- [5] 江佛潮等, 中华消化杂志, 11:222, 1991.
- [6] Bradford, M. M., *Analytical Biochemistry*, 72:248, 1976.
- [7] Laemmli, *Nature*, 227:680, 1979.
- [8] Dickson, R. C., et al., *J. Bact.*, 137:51, 1979.
- [9] Bierman, L., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 167:379, 1968.
- [10] Pedrique, M., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:303, 1982.
- [11] Wandorff, W. L., et al., *J. Milk Food Technol.*, 34:303, 1971.
- [12] De Bales, S. A., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:1201, 1979.
- [13] Ludwig, B., *Biochem. Biophys. Acta*, 167:374, 1968.
- [14] Wallenfes, K., *Methods in Enzymology*, 5:212, 1962.
- [15] Vassillis, G., et al., *Process Biochemistry*, 2:2, 1985.
- [16] Mahoney, R. R., et al., *J. Food Sci.*, 43:584, 1978.
- [17] Szabo, G. and R. Davies, *J. Gen. Microbiol.*, 37:99, 1964.

Purification and Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*

Shen Weiqun Guo Jieyan Li Yongfu

(Dept. of Microbiology and Microbial Technology, Fudan Univ., Shanghai 200433)

Chen Huiping

(Shanghai New Type Factory, Shanghai 200437)

Crude extract containing β -galactosidase(E.C. 3.2.1.23)specific activity of 5.56u/mg was obtained from *K.lactis* through high pressure homogenizer. β -galactosidase was purified 66.2 fold by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, acetone precipitation, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and DEAE-Sephacel chromatography. The purified enzyme gives a specific activity of 370u/mg(using O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as the substrate). When the purified enzyme was subjected to SDS-PAGE, one band with an apparent molecular weight of 85000Da was observed. The enzyme showed a pH optimum within pH6.4—6.8, and temperature optimum of 40°C. It lost 90% activity when incubated at 50°C for 15min. The K_m for ONPG is 2.78mmol/L. β -galactose, the natural product of this enzyme, has some inhibitive effect while ribose strongly inhibites the enzyme. Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , PCMB and NBS also strongly inactivate the enzyme. The purified enzyme gives maximum activity at the presence of Mg^{2+} , Mn^{2+} and 2-mercaptoethanol.

Key words *Kluyveromyces lactis*; β -galactosidase; protein purification