

嗜热脂肪芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶的性质

魏东芝 陈少欣 王筱兰 袁勤生 俞俊棠

(华东理工大学生物化学研究所 上海 200237)

摘要:利用硫酸铵分级沉淀、离子交换层析(DEAE-22)、Sephadex G-75 凝胶过滤从嗜热脂肪芽孢杆菌胞内

收稿日期:1999-10-18, **修回日期:**2000-12-15

提纯得到 β -半乳糖苷酶。研究表明,该酶最适表现反应温度和最适pH分别为60℃和6.4。在50℃该酶具有良好的热稳定性。碱金属和碱土金属盐对酶有激活作用,重金属 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 抑制酶的活力。巯基保护剂能明显增强酶的活力,而巯基结合试剂强烈抑制酶的活性。该酶对 β -D糖苷键具有高度专一性,与糖苷键相连的配基对酶活力也有很大影响。在55℃,酶作用于底物ONPG和乳糖的米氏常数 K_m 分别2.63mmol/L和4.93mmol/L,最大反应速度分别为 $1.93 \times 10^{-5} \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$ 和 $6.54 \times 10^{-5} \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$ 。乳糖的水解产物葡萄糖抑制酶活力,其抑制常数2.47mmol/L,但半乳糖没有这种效应。另外,该酶具有转半乳糖苷的活力,在水解乳糖过程中,生成包括三、四糖的半乳糖低聚糖。

关键词:嗜热脂肪芽孢杆菌, β -半乳糖苷酶,低聚半乳糖

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)-01-018-05

PROPERTIES OF β -GALACTOSIDASE FROM *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

WEI Dong-Zhi CHEN Shao-Xin WANG Xiao-Lan YUAN Qin-Sheng YU Jun-Tang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: A thermostable intracellular β -galactosidase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* was purified by a combination of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, ion-exchange (DEAE-22) and gel filtration (Sephades G-75). The optimum temperature and pH of the enzyme activity were 60°C and pH 6.4 respectively. The β -galactosidase activity exhibited thermostability at 50°C. The enzyme was significantly activated by alkali and alkali-earth metal ions. The activity was inhibited by Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} . Reducing agents enhanced β -galactosidase activity. Thiol-binding agents drastically decreased the enzyme activity. The enzyme was specific for β -D glycosidic linkages, and the identity of the aglycone moiety also influenced enzyme activity. At 55°C the K_m for O-nitrophenyl- β -D-galactosidase (ONPG) and lactose were 2.63mmol/L and 4.93mmol/L, respectively, and V_{max} for both substrates were $1.93 \times 10^{-5} \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$ and $6.54 \times 10^{-5} \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$, respectively. The enzyme was inhibited by glucose (the products of lactose hydrolysis, K_i 2.47mmol/L), but not by galactose. In addition, the enzyme possessed transgalactosylation activity. Galacto-oligosaccharides, both tri- and tetrasaccharide, were involved in the products during lactose hydrolysis.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, Thermostable β -galactosidase, Galacto-oligosaccharides

β -半乳糖苷酶,又称乳糖酶,主要催化水解乳糖生成半乳糖和葡萄糖。它可用于生产低乳糖食品,改善乳制品的风味和营养,解除乳糖不耐受患者因食用乳制品而引起的腹泻、腹胀等多种不良反应,除了具有水解能力外,该酶在水解糖过程中还会发生转糖苷反应,生成具有多种生理功能的低聚半乳糖(GOS)。因而,近年来有关 β -半乳糖苷酶的研究与开发受到广泛的重视。

β -半乳糖苷酶主要来源于动物、植物、细菌、酵母、真菌或霉菌。国外已经商品化的 β -半乳糖苷酶主要来源于大肠杆菌、黑曲霉、米曲霉、酵母、乳酸杆菌等^[1]。一般而言,这些菌种所产生的酶反应温度较低、热稳定性不好,在乳制品生产应用中有一定局限性。因为高温酶在生化反应中具有一些明显的优点,如可以加快反应速度和减少微生物污染。因此人们更注重对一些耐热 β -半乳糖苷酶生产菌株的研究^[2-6]。本实验室筛选到一株产 β -半乳糖苷酶的菌株,经鉴定为嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*),它能在50℃~65℃以乳糖为主要碳源的发酵培养基中产生 β -半乳糖苷酶。目前,还未见有关此 β -半乳糖苷酶的研究报道,本文主要对该酶进行纯化和酶学特性的鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:嗜热脂肪芽孢杆菌,本实验室保藏菌种。

1.1.2 试剂:葡萄糖测定试剂盒,卫生部上海生物制品研究所生产;邻硝基苯基 β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、*p*-硝基苯基 β -D-吡喃半乳糖苷(*p*-Nph β -D-gal)、*p*-硝基苯基 β -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-Nph β -D-glc)、对萘甲酰基 β -D-吡喃半乳糖苷(*p*-Nap β -D-gal)、对萘甲酰基 β -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-Nap β -D-glc),均购于上海生物化学试剂公司;其它试剂购于上海化学试剂公司,均为市售化学纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 无细胞提取液制备:取发酵液,离心收集菌体。利用丙酮破除细胞壁,制取粗酶。称取粗酶 2g,溶于 100mL,0.2mol/LpH7.0 磷酸盐缓冲液中,轻微搅拌 2h,于 20 C、 1×10^4 r/min 离心 30min,取上清液用于下一步分离提取。

1.2.2 酶的纯化:取无细胞提取液 100mL,用 30%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 去除沉淀,取上清液继续加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 60%的饱和度,离心收集沉淀,溶于 pH6.5,0.01mol/L 磷酸盐缓冲液,用同一缓冲液透析过夜。然后将酶液加入预先用,0.01mol/L,pH6.5 平衡过的 DEAE-22 层析柱,先用相同的缓冲液 200mL 洗涤,再改用含有 0.5%~3%NaCl 的上述缓冲液进行阶段洗脱(NaCl 增量为 0.5%),合并有较高的酶活力峰。所收集酶液经超滤浓缩后,经过 SephadexG-75 凝胶柱,收集有酶活力峰。

1.2.3 乳糖水解反应:配制浓度 40%(w/v)乳糖液(pH6.5 磷酸盐缓冲液)20mL,加入 β -半乳糖苷酶,置于带夹套反应罐内,反应温度 55 C。间歇取样 0.3mL,经沸水浴加热 15min,离心,取上清液用高效液相色谱分析产物成分和浓度。

1.2.4 酶活的测定:具体测定方法见文献[7]。酶活定义:在 pH6.5、55 C,每分钟水解 5%(w/v)乳糖产生葡萄糖的微摩尔数为 1 个单位。

1.2.5 糖的测定:用高效液相色谱法,系统为 Shimadzu HPLC,Shimadzu RID 10A 示差检测器,Lichrosorb PR18 层析柱,移动相为乙腈:水=70:30(V/V),进样量 10 μ L。

2 结果与讨论

2.1 酶的纯化

嗜热脂肪芽孢杆菌经发酵培养,检测到它能产生胞内 β -半乳糖苷酶,用前述方法进行细胞破壁和酶的抽提,然后采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、离子交换层析和凝胶过滤(图 1)得到纯化的酶,纯化倍数为 7.3,得率 18%。

2.2 酶的最适 pH

反应温度 55 C 条件下,测定不同 pH 时酶的活力,结果表明在 pH5.5~6.5 之间酶活力较高。这与文献报道的来源于细菌 β -半乳糖苷酶最适 pH 值类似,根据这个性质,这类酶可适用于中性乳清及牛乳的水解。

2.3 酶的最适温度及热稳定性

pH6.4 条件下,分别在 35 C~75 C 温度下测定酶的活力,结果表明在 60 C 时,酶的水解活力最高,在 65 C~70 C 之间的相对酶活力仍大于 60%,说明此酶能在较高的温度下进行反应。

为了考察酶的稳定性,分别在 50 C、55 C、和 60 C 测定酶的残余活力,结果如图 2。设酶失活符合一级失活动力学方程,可求得 50 C、55 C 和 60 C 酶活力半衰期分别为 116h、14h 和 0.9h,说明此酶在 50 C 具有良好的热稳定性。因此,在实际的反应中,考虑到酶的稳定性,反应温度宜用 50 C ~ 55 C。

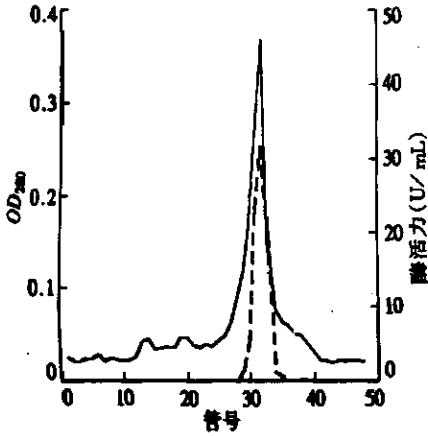


图1 Sephadex G-75 洗脱曲线
—OD₂₈₀, ...酶活力

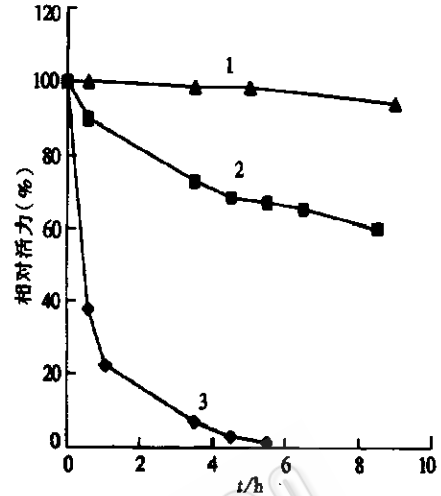


图2 β -半乳糖苷酶的热稳定性
1 50 C, 2 55 C, 3 60 C

表1 金属离子、激活剂和抑制剂对酶活力的影响

试剂	浓度 (mmol/L)	相对活力 (%)
对照	—	100
金属离子		
K^+	100	123
Li^+	1.5	105
Ca^{2+}	1.5	118
Mg^{2+}	1.5	205
Mn^{2+}	1.5	236
Zn^{2+}	1.5	13
Fe^{3+}	1.5	4
Co^{2+}	1.5	57
Cu^{2+}	1.5	1
巯基-酶抑制剂		
Iodoacetic acid	1.0	27
P-Chlormercuribenzene	1.0	0
sulphonic acid		
巯基保护试剂		
DTT	1.0	214
Mercaptoethanol	1.0	126

2.4 金属离子、激活剂和抑制剂对酶影响

金属离子、激活剂和抑制剂对酶活力的影响见表1。碱金属和碱土金属对酶活力具有一定的激活作用。 Mg^{++} 和 Mn^{++} 对该酶活力也有促进作用,有些文献报道的 β -半乳糖苷酶会受到这两种离子的抑制。重金属离子对酶活力有强烈的抑制作用,这可能是重金属离子与酶蛋白侧链的残基,如巯基结合或起氧化作用,导致酶失活。

巯基结合试剂如碘乙酸、对羟基汞基苯甲酸能特异性地与巯基结合,从而抑制酶的活力,从实验结果可以推测出 β -半乳糖苷酶的活性中心含有巯基。而巯基保护试剂如DTT、巯基乙醇对酶活力有显著的激活作用,主要是巯基保护试剂保护酶活性中心的巯基不被氧化。

2.5 酶对底物专一性

选择不同底物,研究 β -半乳糖苷酶对 β -D-糖苷键作用的专一性(表2)。结果可知,此酶对 β -D-糖苷键具有严格的专一性,只水解通过 β -D-糖苷键连接的底物。而对蔗糖、麦芽糖没有水解活力。同时,与半乳糖苷或葡萄糖苷相连的配基对酶活力也有很大的影响,对-硝基苯酚基团对酶活力有激活作用,而 β -萘甲酰基团会抑制酶的活力。

2.6 动力学参数的测定

测定酶的反应初速度,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,求取动力学参数 K_m 和 V_{max} 。得到 K_m 和 V_{max} 分别为 4.39mmol/L 和 $6.54 \times 10^{-5}\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{protein}$ 。利用同样方法得到以 ONPG 为底物, K_m 和 V_m 分别为 2.63mmol/L 和 $1.93 \times 10^{-5}\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{protein}$ 。从两者 K_m 的差异可知 β -半乳糖苷酶对不同物质的 β -D-半乳糖苷键的亲合力不一样。

2.7 乳糖水解产物对酶活力的影响

为了考察乳糖水解产物对酶活力的影响,分别在乳糖反应液中加入一定量的葡萄糖或半乳糖,测定酶的反应初速度。用 Dixon 作图法求取抑制常数,结果表明半乳糖不会抑制酶的水解活力。而葡萄糖是 β -半乳糖苷酶的竞争性抑制剂,其抑制常数 $K_i = 2.47\text{mmol/L}$ 。

2.8 β -半乳糖苷酶转糖苷研究

β -半乳糖苷酶水解 40%乳糖的反应过程见图 3,从图可知,随着反应的进行,乳糖逐渐被水解成单糖(葡萄糖和半乳糖)。同时,反应产物经 HPLC 检测,还包括有三、四糖,这是 β -半乳糖苷酶通过转糖苷反应生成的半乳糖低聚糖(GOS),GOS 的最大得率约占总糖的 28%,表明该酶具有水解和转糖苷两种功能,可用牛乳水解和生产具有生理活性的半乳糖低聚糖。

表 2 酶对不同底物的水解活力

底物	相对活力
ONPG(α -Nph β -D-Gal, 对照)	100
蔗糖	0
麦芽糖	0
P-Nph β -D-Gal	143
P-Nph β -D-Glc	127
P-Nap β -D-Gal	35
P-Nap β -D-Glc	27

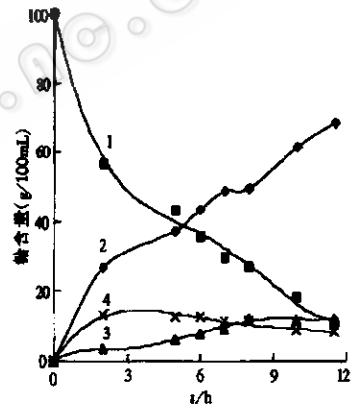


图 3 乳糖水解的反应历程

1 乳糖, 2 半乳糖和葡萄糖, 3 三糖, 4 四糖

致谢 本文承蒙中国科学院生物化学研究所袁中一研究员的指导,在此表示感谢。

参 考 文 献

[1] Vassilis G, Miguez L. L. *Process Biochemistry*, 1985, **12**: 2~12.
 [2] Buonocore V O, Sgambati M, De Rosa E, et al. *J Appl Biochem*, 1980, **2**: 390~397.
 [3] Grogan D W. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 1644~1649.
 [4] Norimasa O, Takshi T. *Applied Environ Microbiol*, 1995, **61**(1): 4026~4030.
 [5] Lind D L, Daniel, R M Cowan D A, et al. *Enzyme Microb Technol*, 1990, **11**: 180~186.
 [6] Jane L B, Byony H L, Christophe Lacroes. *Biotechnol Appl Biochem*, 1997, **25**: 29~41.
 [7] Prenosil J E, Stuker E, Bourne J R. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**: 1026~1031.