

聚 β -羟基丁酸酯解聚酶相关性质的研究*

陈 珊 刘东波 夏红梅 何孟元 郝 水

(东北师范大学生命科学院 长春 130024)

庄宇钢 安玉贤 董丽松

(中国科学院长春应用化学研究所 长春 130022)

摘要: 从不同环境和地域的活性污泥中分离筛选出 3 种可降解聚 β -羟基丁酸酯 (PHB) 的菌株, 编号分别为 DS9701、DS9710 和 DS9713。对其所产生的 PHB 解聚酶的相关性质进行了研究。3 种菌株所产生的 PHB 解聚酶均是胞外酶, 同时又都是诱导酶。不同菌株分泌 PHB 解聚酶的规律不同, 但酶活力达到高峰的时间均为 96 h。3 种粗酶液的表现最适反应温度均为 40℃ ~ 45℃, 对粗酶液的最适反应 pH 也进行了表征。

关键词: 聚 β -羟基丁酸酯解聚酶, 胞外酶, 诱导酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0050-05

STUDY ON THE PROPERTIES OF POLY (β -HYDROXYBUTYRATE) DEPOLYMERASE

CHEN Shan LIU Dong-Bo XIA Hong-Mei HE Meng-Yuan HAO Shui

(College of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024)

ZHUANG Yu-Gang AN Yu-Xian DONG Li-Song

(Changchun Institute of Applied Chemistry Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract: Three strains having degrading poly (β -hydroxybutyrate) (PHB) activity were isolated from activated sludge of different ecological environments and areas, named DS9701, DS9710 and DS9713. The properties of PHB depolymerase produced by DS9701, DS9710 and DS9713 were studied. All the PHB depolymerases are extracellular enzyme and are induced enzyme. The time that enzyme activities of the PHB depolymerases reach the maximum is 96 hours after inoculation. The apparent optimal temperature range for crude enzymes extract is 40℃ ~ 45℃.

Key words: Poly (β -hydroxybutyrate) depolymerase, Extracellular enzyme, Induced enzyme

采用生物发酵技术获得的聚 β -羟基丁酸酯 (PHB) 具有生物降解和生物相容等特性, 它不仅可以为工业、农业、医药以及人们的日常生活等方面提供新的材料来源, 而且将对消除“白色污染”改善人类自身的生存环境有着重要意义。在国外, 一些国家已进行了细菌发酵 PHB 的工业化生产, 英国帝国化学工业公司 (ICI) 居于领先地位。在我国, 对 PHB 的研究起步较晚, 但进展较快, 有关 PHB 合成方面的报道也较多, 尤其是中国科学院微生物研究所近年来对 PHB 的生物合成取得了突破性进展, 为 PHB 的工业化生产打下了基础。然而, 有关 PHB 生物降解方面的报道却很少。本项工作是关于 PHB 降解特性系列研究工作之一, 主要对 PHB 解聚酶的相关性质进行了研究, 为 PHB 的应用奠定理论基础。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 29774031)

Project of Chinese National Natural Science Fund (No. 29774031)

收稿日期: 2001-03-09, 修回日期: 2001-07-20

1 材料与方法

1.1 菌株

从不同环境和地域采集活性污泥和泥土样品,经分离、筛选获得3株能降解PHB的菌株,经初步鉴定两株为青霉(*Penicillium* sp.),分别编号为DS9701和DS9713;另一株为毛霉(*Mucor* sp.),编号为DS9710。

1.2 PHB

美国Aldrich公司产品,由微生物发酵合成,白色粉末。熔点172℃,分子量 27×10^4 D。

PHB膜的制备:将PHB粉末在180℃热压机上预热2min,保压(50kg/cm²)1min后转移到冷压机上(室温),冷却至室温,获得厚度为0.1mm的PHB膜。

1.3 培养基

NH₄Cl 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, CaCl₂·2H₂O 0.005g, PHB 1.5g, 66mmol/L KH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH6.8), 定容1L。

1.4 点植培养法

将无菌接种环蘸以极少量孢子,点植于固体平板培养基上适当位置,使接种点位于等边三角形的3个顶点上。将培养皿倒置于28℃恒温箱中,培养后观察结果。

1.5 胞外酶的液体培养测试法

将斜面菌种移入含有PHB粉末的无菌液体培养基中,28℃振荡培养(100r/min)。当培养液中PHB颗粒消失时,终止培养。冷冻离心40min(10000×g)除去菌丝体,倾出上清液,并对上清液进行无菌检查。将已称重的PHB膜放入无菌上清液中,40℃水浴振荡培养。一定时间后将PHB膜取出,用甲醇、蒸馏水冲洗数遍后,烘干称重。

1.6 诱导酶的测试方法

按1.3中培养基配方,将其中的PHB粉末更换为不同种类的碳源,灭菌后接种,培养一定时间后,4℃10000×g离心30min,除去菌丝体,将上清液做无菌检查后,测定无菌上清液中PHB解聚酶对PHB膜的降解速率。

1.7 酶活力测定

PHB悬浮液的制备:将PHB粉末溶于氯仿中,所得溶液与十二烷基磺酸钠溶液混合,混合液经超声波处理5min制得PHB乳化液,加热除去氯仿得到PHB悬浮液^[1]。

酶活性测定及酶活单位定义:取3mL PHB悬浮液置于40℃恒温水浴,待温度平衡后加入酶液,反应一定时间后,于650nm波长下测其光吸收(降低)。酶活定义为在上述反应条件下,每分钟引起光吸收降低0.001单位所需的酶量为一个酶活力单位^[2-4]。

1.8 蛋白质含量测定

采用Lowry法^[5],以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 实验结果

2.1 PHB解聚酶的定位

2.1.1 固体培养法测试:将PHB粉末作为唯一碳源掺入培养基中,3个菌株分别接种在固体培养基上,经一段时间的保温培养后,可见3个菌株周围均出现透明圈(见图1)。透明圈的出现说明待测的3个菌株所产生的PHB解聚酶均是胞外酶,在菌体生长过程中酶分泌到培养基中,将PHB粉末降解而使该处培养基呈透明状态。

2.1.2 液体培养法测试: 将3个菌株分别接种到以PHB为唯一碳源的液体培养基中, 经培养后离心弃菌体, 测定无菌上清液对PHB膜降解速率。结果见表1。

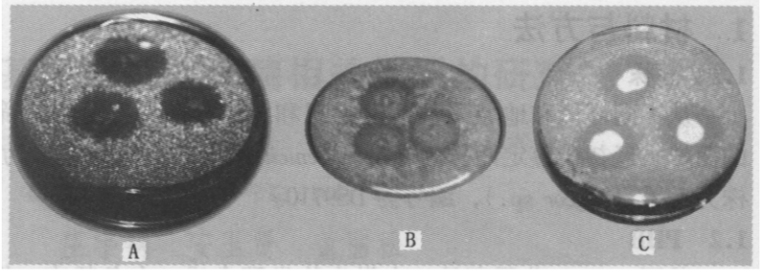


图1 不同菌株在含有PHB粉末的平板培养基上产生的透明圈
A DS9701, B DS9710, C DS9713

由表1可见, 3个菌株发酵液除去菌丝体后, 其无菌上清液均可降解PHB膜, 说明上清液中确有PHB解聚酶存在。DS9701、DS9710和DS9713菌株所产生的解聚酶可在26~65h内将PHB膜完全降解。因此可以得出结论, DS9701、DS9710和DS9713菌株所产生的PHB解聚酶均为胞外酶。

表1 PHB膜在上清液中的降解速率

菌株	PHB膜重量 (mg)	降解时间 (h)	失重率 (%)
DS9701	11.8	26	100
DS9710	11.3	65	100
DS9713	11.9	43	100

2.2 PHB解聚酶的类型

分别用葡萄糖、淀粉、蔗糖、乳糖、甘露醇等碳源代替培养基中的PHB粉末作为唯一碳源, 对DS9701、DS9710、DS9713菌株进行了测试。培养时间均为96h, 冷冻离心除去菌丝体后得无菌上清液50mL, 降解PHB膜的时间均为70h。结果见表2。

表2 不同碳源对PHB膜降解的影响

菌株	碳源	原始重量 (mg)	降解后重量 (mg)
DS9701	葡萄糖	10.7	10.6
	淀粉	12.7	12.4
	蔗糖	13.1	13.1
	乳糖	10.2	10.1
	甘露醇	8.2	8.2
DS9713	葡萄糖	8.2	8.2
	淀粉	9.6	9.6
	蔗糖	7.7	7.7
	乳糖	10.3	10.3
	甘露醇	9.4	8.9
DS9710	葡萄糖	8.3	8.3
	淀粉	8.1	8.1
	蔗糖	8.2	8.2
	乳糖	9.0	8.9
	甘露醇	9.2	9.2

由表2可以看出, 当用其它碳源代替PHB作唯一碳源时, 用所得无菌上清液降解PHB膜, PHB膜重量几乎不发生变化, 这说明上清液中没有PHB解聚酶存在或其含量极小, 活性甚低。因此可以认为, PHB解聚酶是一种诱导酶, 它是在PHB存在的情况下才产生的, PHB是PHB解聚酶的诱导物。

2.3 不同菌株分泌PHB解聚酶的规律

为了对PHB解聚酶进行分离纯化及今后的应用, 我们对DS9701、DS9710和DS9713菌株分泌PHB解聚酶的规律进行了探讨。将DS9701、DS9710和DS9713菌株分别按照各自的最适培养条件进行培养, 每隔24h取样, 冷冻离心除去菌体, 分别测定酶活性和蛋白质含量。不同菌株分泌PHB解聚酶规律如图2所示。

由图2可以看出, DS9701菌株培养24h, 已有PHB解聚酶的分泌, 48h后, PHB解聚酶的分泌呈直线增加, 酶活性大幅度上升, 至96h后, 产酶速度减慢, 酶活力不再增加, 而呈迅速下降趋势。而DS9710菌株培养24h没有PHB解聚酶的分泌, 24h以后逐渐开始分泌PHB解聚酶, 96h酶活力达到高峰, 随后酶活力迅速下降, 到第8d时活力几乎全消失, 而此时蛋白质含量却很高, 可能是部分菌体自溶所致。DS9713菌株酶的分泌规律类似DS9710菌株, 培养至96h酶活力达到高峰, 所不同的是96h后酶活力缓

慢下降,到发酵终止,酶活力仍可达 5.2 u/mL。

由以上的分析可以看出,不同的菌株分泌 PHB 解聚酶的规律不同,其原因与菌体的生长特性及胞外酶的合成方式有关。但 3 个菌株酶活力达到高峰时均为 96 h。因此,在酶的提取和精制时可以在此时收获。

2.4 温度对 PHB 解聚酶的影响

将 PHB 悬浮液分别置于 20℃ ~ 60℃ 的水浴中预热 10min, 然后加入一定量的酶液, 保温 30min, 测定酶液在不同反应温度下的相对酶活力。结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, 不同菌株所产生的 PHB 解聚酶的最适反应温度基本相似, 均为 40℃ ~ 45℃ 之间, 但不同的酶耐热性能不同, DS9701 菌株所产生的解聚酶在 50℃ 时酶活力可达最大酶活的 68%, 而其它两种 PHB 解聚酶活力在 50℃ 时分别为 14.3% 和 20.8%。

2.5 pH 对 PHB 解聚酶的影响

采用 DS9701、DS9710、DS9713 菌株的粗酶液对其各自的最适反应 pH 值进行了测定。结果发现 DS9701 菌株和 DS9710 菌株产生的 PHB 解聚酶的最适反应 pH 值曲线有两个峰, 即 pH4.0 和 pH6.0。DS9713 菌株产生的 PHB 解聚酶的最适反应 pH 值曲线仍然存在两个明显的峰, 但为 pH5.5 和 pH 9.0。

3 讨论

通过实验证明了 PHB 解聚酶是一种胞外酶, 同时又是诱导酶。PHB 是 PHB 解聚酶的诱导物, 这样大的底物是通过何种途径进入细胞内, 我们设想有两种可能: (1) 细胞可以直接吸收 PHB 而发生诱导作用。一些研究者发现某些微生物在特定条件下, 可以直接把核酸、蛋白质等大分子吸收到体内^[6]。作为可产生 PHB 解聚酶的 DS97 系列菌株, 有可能在特定的条件下可以直接吸收 PHB。(2) 在作用底物 PHB 不存在时, 即在非诱导条件下存在着以低速率合成的组成酶^[7]。在作用底物 PHB 存在时, 解聚酶使 PHB 降解产生小分子低聚物, 这些低聚物进入细胞发生诱导作用。但如果外界环境条件不适合, 如 pH、温度过高或过低, 酶促反应产物无从产生, 就不会引起诱导现象。

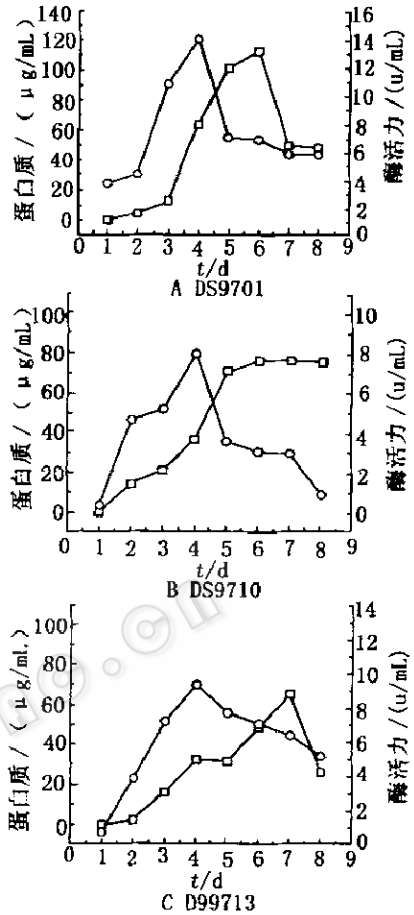


图 2 不同菌株分泌 PHB 解聚酶的规律
□—蛋白质 (μg/mL),
○—酶活力 (u/mL)

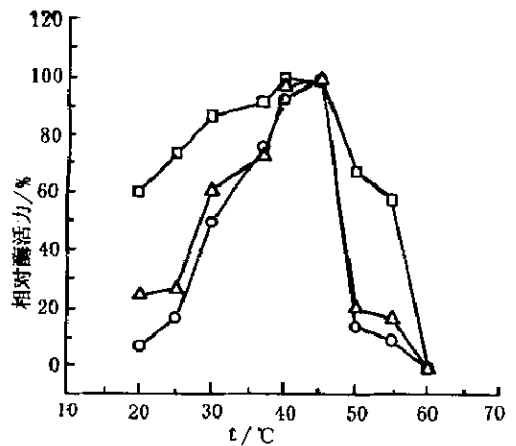


图 3 温度对 PHB 解聚酶的影响
□—DS9701, ○—DS9710, △—DS9713

对3种不同菌株所产生的PHB解聚酶的最适反应pH值进行测定后发现,其pH与酶活性曲线均有两个峰,因此,可以推测该酶有两种组分,而两种组分的最适反应pH值不同。我们曾对DS9701菌株产生的PHB解聚酶进行了分离纯化,这种推测在酶的分离和纯化过程中得到了证实。我们认为DS9710和DS9713菌株产生的PHB解聚酶可能和DS9701菌株产生的PHB解聚酶一样,具有两种或多种组分,这将在我们下一步的工作中深入研究。

参考文献

- [1] Horowitz D M, Sanders J K M. *J Am Chem Soc*, 1994, **116** (7): 2695 ~ 2697.
- [2] Shirakura Y, Fukui T, Saito T, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, **880**: 46 ~ 53.
- [3] Brucato T L, Wong S S. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991, **290** (2): 497 ~ 502.
- [4] Stinson M W, Merrick J M. *J Bacteriology*, 1974, **119**: 152 ~ 161.
- [5] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* *J Bio Chem*, 1951, **193**: 265 ~ 275.
- [6] 李季伦, 张伟心, 杨启瑞, 等. *微生物生理学*. 北京: 北京农业大学出版社, 1993, 88 ~ 90.
- [7] 普里斯特著, 张宗玉译. *细胞外酶*. 北京: 科学出版社, 1988, 24 ~ 28.