

嗜热脂肪芽孢杆菌耐热木糖异构酶的特性

周世宁 黄 蕾 陆勇军 罗进贤 李甘霖*

(中山大学生物化学系 广州 510275)

摘要 嗜热脂肪芽孢杆菌在木糖或木聚糖诱导下产生木糖异构酶。从破碎细胞中分离到该酶。经硫酸铵沉淀,热处理及 Sephadex G-200柱层析等步骤获得纯化了19倍的酶制备物。该酶反应的最适pH值为7.5,在pH6.2~8.0范围内稳定,最适反应温度为80℃,低于此温度时酶有很好稳定性。该酶对底物木糖的 K_m 值为6.67mmol/L, Mg^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 对该酶有激活作用,而 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对酶有抑制作用。酶制备物转化木糖为木酮糖产率为18%。

关键词 嗜热脂肪芽孢杆菌,木糖异构酶,葡萄糖异构酶

分类号 Q93-936

木糖异构酶(EC5.3.15),既能催化木糖转化为木酮糖,也能催化葡萄糖转化为果糖。该酶是迄今唯一被应用于高果糖浆大规模商业化生产的酶^[1]。木糖异构酶的另一重要潜在应用在于可再生半纤维素资源的开发。半纤维素占植物成分的20%~30%,大部分为木糖聚合物,木糖经异构化后得木酮糖,后者能为酿酒酵母发酵产生酒精。酒精是一种环保燃料,可替代有限的能源石油。在酶的生产和应用过程,耐热菌种及热稳定的木糖异构酶有很多优点,例如减少污染,降低冷却能耗,延长酶的寿命及提高转化率等。目前关于该酶的研究多从高果糖浆生产的角度考虑。本文从一株嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)制得热稳定性良好的木糖异构酶,经初步纯化后,研究了该酶转化木糖的反应特征。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

1.1.1 菌种:嗜热脂肪芽孢杆菌从广东省微生物研究所获得,本室编号为BST-3;酿酒酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*) 36,酵母(*Saccharomyces sp.*) T1和PS-1均为中山大学微生物基因工程室保存菌株。

1.1.2 试剂:木糖为上海试剂二厂产品,木酮糖为Sigma公司产品,二硫苏糖醇(DTT)为Promega公司产品,半胱氨酸盐酸盐为上海康达氨基酸厂生产,咔唑(Carbazole)德国产品, Sephadex G-200从Pharmacia公司购入。

1.2 培养基

LB培养基(%):蛋白胨1.0,酵母膏0.5, NaCl 1.0, pH7.0~7.2;产酶培养基(%):木糖0.2,蛋白胨0.5,酵母膏0.2, NaCl 1.0, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.1, pH7.0~7.2。

1.3 木糖异构酶活力测定^[2]

1.3.1 酶反应条件:0.1MD-木糖50 μ l,酶液50 μ l, 10mmol/L $MnSO_4$ 50 μ l,缓冲液(Tris-HCl pH7.5)850 μ l, 80℃,反应1h,沸水浴终止反应,稀释到10ml,吸取其中0.7ml测定木酮糖生

* 香港理工大学
中山大学科学研究基金资助
1997-10-13收稿

成量,用经灭活的酶液代替活酶液作对照。

1.3.2 木酮糖测定:向反应稀释液(0.7ml)依次加入 13mol/L H_2SO_4 6ml, 1.5% 半胱氨酸盐酸盐溶液 0.2ml, 0.12% 吡唑酒精溶液 0.2ml, 混匀, 室温放置 2h, 于 540nm 处测定光吸收。据木酮糖标准曲线求得木酮糖量。

1 酶活单位定义为每分钟催化产生 1 μ mol 木酮糖的酶量。

1.4 蛋白质测定^[3]

用考马斯亮蓝法。以牛血清白蛋白为标准品作标准曲线。

1.5 木糖含量测定^[4]

用 3,5-二硝基水杨酸法。

1.6 酶的纯化

1.6.1 粗酶液制备^[5]:取 1ml 经在 LB 培养基活化培养的嗜热脂肪芽孢杆菌 BST-3, 转接到 100ml 产酶培养基, 45℃ 振荡培养 10h, 离心收菌体, 用 5m mol/L Tris·HCl(pH7.5) 缓冲液洗涤, 菌体重悬于 1/10 原体积缓冲液, 超声波破碎细胞, 离心取清液即为粗酶液。

1.6.2 硫酸铵沉淀:以 50% 饱和度除杂蛋白后, 以 90% 饱和度沉淀酶蛋白, 沉淀物溶于含 Mn^{2+} 的 Tris·HCl(5m mol/L, pH7.5) 缓冲液中, 对同一缓冲液透析 24h 以上(4℃)。

1.6.3 热处理:酶液置 80℃ 水浴 5min, 冷却、离心取清液。

1.6.4 Sephadex G-200 柱层析:经予处理的凝胶以自然沉降法装柱, 柱规格为 1.5×30cm, 用相等于柱体积的 5m mol/L Tris·HCl(pH7.5) 缓冲液平衡, 样品经透析后上柱, 用含 0.2N KCl 的 5m mol/L Tris·HCl(pH7.5) 洗脱, 分管收集, 分别测定蛋白含量及酶活性。

2 结果

2.1 木糖异构酶的诱导产生

改变产酶培养基中的糖类, 发现嗜热脂肪芽孢杆菌 BST-3 在有木糖或木聚糖存在的情况下均能产生木糖异构酶, 但木糖诱导效果最好, 葡萄糖、果糖、甘油和淀粉均不能诱导该菌产生木糖异构酶。在含木糖的产酶培养基中, 接种

嗜热脂肪芽孢杆菌 BST-3, 45℃, 振荡培养, 跟踪测定细胞浊度、木糖残余量及木糖异构酶活力。从图 1 可知, 当生长进入对数期不久, 酶活开始上升, 直至木糖耗尽, 细胞浊度不再增加时, 酶活达最高值, 然后酶活下降至一个中等水平。此实验表明 10h 的培养物适宜用于回收木糖异构酶。

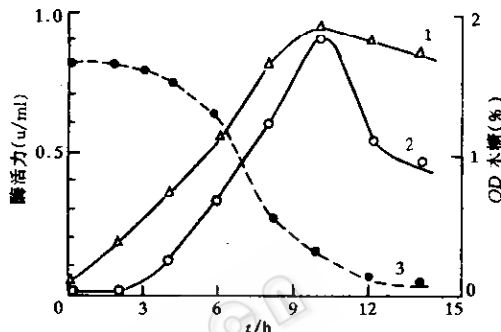


图1 培养过程木糖异构酶活力变化

1. 生长; 2. 酶活; 3. 木糖

2.2 木糖异构酶的纯化

从产酶高峰期细胞中提取胞内酶, 经硫酸铵沉淀和 80℃ 加热处理, 酶的比活从 0.087u/mg 提高到 0.433u/mg, 纯化了 5 倍, 回收率为 58.3%; 再经 Sephadex G-200 柱层析(图 2), 获得比活为 1.66u/mg 的酶制备物 34ml, 提纯了约 19 倍, 收率为 54.8%。各步纯化结果见表 1。

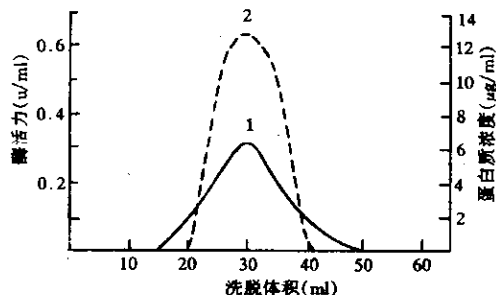


图2 Sephadex G-200柱层析

1. 蛋白质; 2. 酶活

2.3 木糖异构酶的性质

2.3.1 酶的动力学常数:反应系统中以定量酶分别与不同浓度的底物木糖反应, 以每分钟生

成的木酮糖量表示速度,按比例数法作图,据图计算得该酶对木糖的米氏常数 K_m 为 6.67 mmol/L。

表1 木糖异构酶的提纯

分离步骤	总蛋白 mg	总活力 u	比活力 u/mg	提纯倍数	收率 %
粗酶液	76.9	6.695	0.087	—	100
硫酸铵沉淀	37.3	4.330	0.116	1.33	64.47
热处理	9.0	3.900	0.433	5.00	58.25
Sephadex					
G-200层析	2.2	3.670	1.680	19.08	54.82

2.3.2 pH 对酶活性的影响及酶的酸碱稳定性: 用不同缓冲液配制系列 pH 不同的反应系统,使酶在不同 pH 的反应系统中与木糖作用,测定酶活力,结果表明 pH7.5 为该酶的最适 pH。为了测定酸碱对酶稳定性的影响,将酶与不同 pH 的缓冲液混合,在 80℃ 保温 1h,然后加入木糖,并用硼酸缓冲液回调 pH 到 7.5,进行酶活力测定。以酶活力最高者为 100%。结果显示在 pH6.2~8.0 范围内,酶活力保持在 85% 以上;当 pH 大于 8.0 或小于 6.0 时,酶活下降加快。

2.3.3 温度对酶活性及稳定性的影响: 使酶与木糖的反应在 pH7.5 及不同温度下进行,测定酶活性。结果表明该酶在 80℃ 时有最高的酶活性。将酶液分别在不同温度下保温 1h,然后加入木糖,在相同条件下测定酶活。结果显示该酶有很好的热稳定性,70℃ 以下基本不影响酶活性,在最适温度 80℃ 处理时,酶活性保存 90% 以上,但超过 85℃ 后酶的失活加快,95℃ 时酶活几乎完全丧失。

2.3.4 金属离子对木糖异构酶活性的影响: Mg^{2+} 、 Co^{3+} 和 Mn^{2+} 三种离子均对酶有激活作用,而所有试验浓度的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 均对酶有强抑制作用。在 pH7.5, 80℃, 存在 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 时, 1ml 的酶制备物与系统中 10% 的木糖反应 2h, 木糖转化为木酮糖的产率为

18%。

3 讨论

嗜热脂肪芽孢杆菌 BST-3 在 45℃ ~ 60℃ 生长良好,所产的木糖异构酶在 80℃ 以下有很好的稳定性,其催化异构化作用的最适温度为 80℃。这一性质对酶的纯化和应用都有利,在较高温度下异构化将有较高的转化率。本文所得的酶,在 2h 内转化率达到 18%。据报道,木糖的酶促体外转化,反应平衡时仅生成 20% 的木酮糖。就生产来说,菌株 BST-3 并不是一个好的菌株,因为它需要木糖诱导才能最有效地产酶,这在经济上是不合算的。但它可以作为一个出发菌株进行菌种改良,或者作为木糖异构酶基因的供体,构建工程菌。

由于该酶的良好热稳定性,通过简易的热处理步骤,即可使酶的纯度提高几倍,而不必损失太多的酶活。通过 Sephadex G-200 柱一次分离也获得很好效果,使纯度在前一步骤的基础上再提高了 3.8 倍,而总酶活回收率只降低 3.4%。相比之下,硫酸铵沉淀步骤提纯倍数低,只有 1.33,而总收率却下降了 35%。在酶的实际应用中,如热处理和 Sephadex G-200 柱两步纯化可满足固相化需要,应避免硫酸铵沉淀造成的过高的收率损失。

参 考 文 献

- [1] Fogarty W M, C T Kelly. Microbial Enzymes and Biotechnology 2nd., Elsevier Applied Science, London and New York, 1990, p177.
- [2] Dische Z, E Borenfreund. J Biol Chem, 1951, 912: 583~587.
- [3] 张德安主编. 生物大分子实验手册. 长春: 吉林大学出版社, 1991.
- [4] 北京大学生物系生化教研室. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1979.
- [5] Feldmann S D, Sahm H, Sprenger G A. Mol Gen Gent, 1992, 234: 201~210.

CHARACTERISTICS OF XYLOSE ISOMERIZATION CATALYZED BY THERMOSTABLE XYLOSE ISOMERASE FROM *B. STEAROTHERMOPHILUS*

Zhou Shining Huang Lei Lu Yongjun Luo Jinxian Daniel Lee

(Department of Biochemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275).

Abstract Xylose isomerase was produced by *Bacillus stearothermophilus* when the medium contained xylose or xylan. The enzyme was isolated from the cells and purified by ammonium sulphate precipitation, heat-treatment and chromatography on Sephadex G-200 column. The enzyme preparation catalyzed the conversion reaction of xylose to xylulose with the optimum pH 7.5 and the optimum temperature 80°C. Under conditions of pH 6.2~8.0 and temperature below 80°C, the enzyme was stable. The K_m of the enzyme was 6.67 mM when xylose was used as the substrate. The enzyme was activated by Mg^{2+} , Co^{2+} and Mn^{2+} and inhibited by Zn^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} .

Key words *Bacillus Stearothermophilus*, Xylose isomerase, Glucose isomerase