

温特曲霉延胡索酸酶的提纯及性质研究

郑 腾¹ 施巧琴² 吴松刚²

(福建出入境检验检疫局 福州 350001)¹ (福建师范大学生物工程学院 福州 350007)²

摘要:报道经硫酸鱼精蛋白沉淀、硫酸铵分级沉淀和葡聚糖凝胶 G-200 柱层析,再经冰冻干燥后从温特曲霉 F-871 菌体中获得延胡索酸酶,纯化倍数为 31.70,回收率为 36.64%,酶比活性为 24.6U/mg。酶学性质研究表明:酶作用最适 pH 和温度分别为 8.0 和 30℃,稳定 pH 范围为 6.0~8.5,酶在 35℃下保温 30min 后仍残留约 90% 以上的活力。

关键词:温特曲霉,延胡索酸酶,提纯,酶学特性

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0030-05

收稿日期: 2000-11-13, 修回日期: 2001-03-30

PURIFICATION AND PROPERTIES OF FUMARASE FROM *ASPERGILLUS WENTII*

ZHENG Teng¹ SHI Qiao-Qin² WU Son-Gang²

(Fujian Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China Fuzhou 350001)¹

Biological Engineering College of Fujian Normal University Fuzhou 350007)²

Abstract: The fumarase from the culture of *Aspergillus wentii* F-871 was partially by means of precipitation with protamine sulphate, ammonium sulfate fractionation and column chromatography on Sephadex G-200, and then the concentrated enzyme solution was freeze-dried. The comparative enzyme activity of the fumarase was increased by 31.70 times and reached 24.6 U/mg, and the recovery was 36.64%. The optimal pH and temperature was 8.0 and 30°C, respectively. The pH stability of fumarase ranged 6.0~8.5, and more than 90% of the enzyme activity remained after incubated at 35°C for 30 min.

Keywords: *Aspergillus wentii*, Fumarase, Purification, Properties.

延胡索酸酶又名苹果酸裂合酶、延胡索酸水化酶或富马酸酶,它是三羧酸循环中的一个重要的酶,能催化延胡索酸水化合成苹果酸^[1,2]。延胡索酸酶是一种胞内酶,主要存在于动物、植物和微生物细胞的细胞液和线粒体中,对其研究始于20世纪30年代,英国的 Title W 和 Edwin C 最早从猪心细胞中获取了延胡索酸酶的结晶,并对其结构和酶学性质做了初步的研究。80年代,Hitoshi S, Flint D H, Weaver T M 等人从杆状纤毛裸藻、大肠杆菌等细胞中提取了延胡索酸酶。1990年 Kusanne P 等^[3]采用硫酸鱼精蛋白沉淀核酸、亲和色谱法和排阻色谱法等方法从耐高温的 *Sulfolobus solfataricus* 中提纯延胡索酸酶,酶在40°C~90°C时稳定,最适温度为85°C,最适pH为8.0,酶对热和有机溶剂表现出高度的稳定性。1992年前苏联的 Abelyan V A 和 Andreyan N A^[4]采用超声处理和葡聚糖凝胶 G-200 柱层析等方法从 *Brevibacterium* sp. 中分离出延胡索酸酶,最适温度为50°C,最适pH为6.5。1993年 Yoneya T 等人^[5]使用盐析、聚焦色谱法、过滤和离子交换层析等方法从 *Lactobacillus delbrueckii* 中也提取出延胡索酸酶。

相比之下,我国在延胡索酸酶的研究上落后于美、英、日等科技强国。1980年,杨廉婉^[6]在对皱褶假丝酵母固定化细胞产L-苹果酸进行研究时,对延胡索酸酶的一些特性进行了研究,并比较了自然细胞和固定化细胞的酶活及酶学特性。1999年胡纯铨^[7]探讨了海藻酸钠固定化普通变形杆菌延胡索酸酶的性质,结果表明酶催化延胡索酸为L-苹果酸的最适温度为40°C,最适pH为7.0,并研究了Cys和GSH对固定化细胞酶活力的影响。

由于延胡索酸酶在以细胞转化法将延胡索酸直接转化合成L-苹果酸的过程中起着关键的作用,为探索温特曲霉(*Aspergillus wentii*)利用胞内延胡索酸酶转化延胡索酸合成L-苹果酸的最佳培养条件,我们设计了采用硫酸鱼精蛋白沉淀核酸、硫酸铵分级沉淀和柱层析的方法从温特曲霉F-871的菌体中提纯延胡索酸酶,并对酶学特性进行了初步的研究,从而为细胞转化法合成L-苹果酸提供酶学方面的依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

温特曲霉 (*Aspergillus wentii*) F-871。菌种由福建师范大学生物工程学院微生物研

究所提供。

1.2 供试培养基

蔗糖 2g, 黄豆饼粉(按固形物) 0.1g, 小麦粉 0.15g, 玉米浆 0.15g, 酵母 0.3g, NaNO_3 0.15g, K_2HPO_4 0.2g, KCL 0.05g, 葡萄糖 0.3g。

1.3 化学试剂和纯化材料

葡聚糖凝胶 G-200 为 Pharmacia 公司产品; 牛血清蛋白购于上海生化研究所; L-苹果酸和延胡索酸由上海生化试剂商店经销。

1.4 试验设备

752C 型紫外可见分光光度计(上海分析仪器三厂); 超声波破碎仪 SONICS VC601 (美国); G-3 型多用冰冻干燥机(宁波庄桥机电厂)。

1.5 方法

1.5.1 延胡索酸酶活力测定法^[3,8,9]: 取 2mL 0.05mol/L 以 0.05mol/L K_3PO_4 缓冲液 (pH7.5) 配制的 L-苹果酸溶液于试管中, 30℃ 温育 10 min 后, 加入 1 mL 酶液, 在 250nm 下测定光吸收率。根据标准曲线换算成 L-苹果酸浓度, 计算酶活力。一个酶活力单位 (U) 定义为每分钟催化 1 μmol L-苹果酸为延胡索酸所需的酶量。比活性为每毫克蛋白质所包含的酶活力单位 (U/mg)。

1.5.2 延胡索酸酶的提纯方法^[3,5,9,10]: (1) 菌体培养和收获: 将温特曲霉接种于培养基, 在 30℃ 下培养 40h。将含有菌体的发酵液用尼龙网筛过滤后的菌丝, 冲洗数次, 在 3000 r/min 下离心 20 min。(2) 提纯: 取湿菌丝体每克加入 5 mL 0.05mol/L K_3PO_4 缓冲液 (pH7.5), 超声波处理 45 min。再在 20, 000 r/min 下离心, 每 1 mL 上清液加入 0.2 mL 2% (w/v) 硫酸鱼精蛋白, 离心后的上清液进行硫酸铵分级沉淀。离心后将沉淀用 0.05mol/L K_3PO_4 缓冲液 (pH7.5) 透析过夜, 脱水浓缩。将酶液上柱 (4 × 20cm), 用以上相同的缓冲液洗脱, 检测收集液的酶活性及蛋白含量。浓缩酶液在 0℃、 15×10^{-3} Pa 下干燥成酶粉。(3) 蛋白质含量测定: ④紫外分光光度计法: 在 280nm 下测定样品的光吸收率。⑤双缩脲常量测定法: 取 3.0mL 粗酶液加入碱性铜试剂 2.0mL 于 540nm 下测定光吸收率, 对照标准曲线查得蛋白质含量。

2 结果

2.1 延胡索酸酶的提取、纯化

2.1.1 菌体细胞的破碎及核酸的去除: 结果如表 1 所示: 经 10% 饱和度的硫酸铵沉淀, 以除去某些杂蛋白。离心后上清液再加硫酸铵至 55% 饱和度即可将大部分延胡索酸酶沉淀下来, 收集沉淀。

表 1 不同硫酸铵饱和度对延胡索酸酶沉淀的影响

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度 (%)	0	10	20	30	35	40	45	50	55
上清液残留 酶活 (U/mL)	24.33	23.82	22.41	17.60	14.92	8.70	2.81	0.92	/

2.1.2 葡聚糖凝胶 G-200 柱层析: 结果呈现两个蛋白质高峰, 延胡索酸酶蛋白处在第一高峰。如图 1 所示。

2.1.3 延胡索酸酶的提纯过程: 过程如表 2, 冰冻干燥后测得酶粉比活性为 24.6 U/mg。

表 2 温特曲霉 F-871 延胡索酸酶的纯化过程

提纯步骤	总酶活 (U)	总量 (mg)	比活性 (U/mg)	回收率 (%)	纯化倍数
超声波破碎	48620	60025	0.81	100	1
硫酸鱼精蛋白沉淀核酸	47588	56652	0.84	93	1.04
10% (NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	44276	21918	2.02	91.10	2.49
55% (NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	28620	2407	11.89	58.86	14.15
Sephadex G-200 凝胶过滤	17814	694	25.68	36.64	31.70

2.2 酶学性质研究

2.2.1 酶作用最适 pH: 以下试验中不同 pH 采用不同缓冲液 (pH3.0~8.0 为 0.05mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液; pH8.0~11.0 为 0.05mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液) 于 30℃ 保温 1h, 测定酶活力。结果, 酶作用最适 pH 为 8.0。如图 2 示。

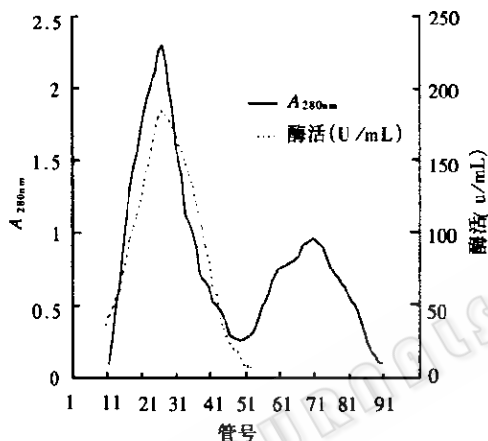


图 1 Sephadex G-200 凝胶过滤

A_{280nm} 表示蛋白质的相对含量, 酶活表示收集液中每毫升延胡索酸酶的酶活, 单位为 U/mL, 每管收集量为 4mL

2.2.2 酶的 pH 稳定性: 取稀释酶液 2 mL 和等量的不同 pH 缓冲液置于 4℃ 下保持 24h, 用 NaOH 或 HCl 调至 pH 8.0 时测定残留相对酶活。结果此酶在 pH 6.0~8.5 范围内较稳定。如图 3。

2.2.3 酶作用最适温度: 在 15℃~55℃ 的不同温度下测定同一酶液的延胡索酸酶活性, 其它反应条件相同。测得酶作用最适温度为 30℃。如图 4。

2.2.4 酶的热稳定性: 取适量的酶液在 pH 8.0 下, 不同温度处理 30min, 再于 pH 8.0, 30℃ 下测其残留相对酶活。结果表明延胡索酸酶在 35℃ 下仍然稳定。如图 5。

3 讨论

L-苹果酸不仅是国际上公认的安全性食品添加剂, 而且也是一种优良的酸味剂和保鲜剂, 在医药工业、印染和建筑行业上也有特殊的用途, 因此很早就引起人们的关注。尽管 L-苹果酸的生产方法很多, 然而可应用于工业化生产的主要是化学合成法和固定化

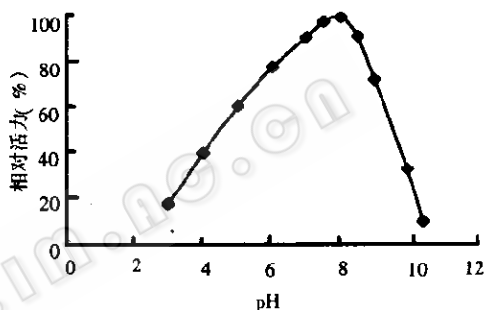


图 2 pH 对延胡索酸酶活力的影响

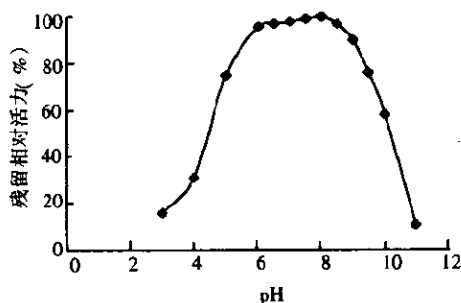


图 3 pH 对延胡索酸酶稳定性的影响

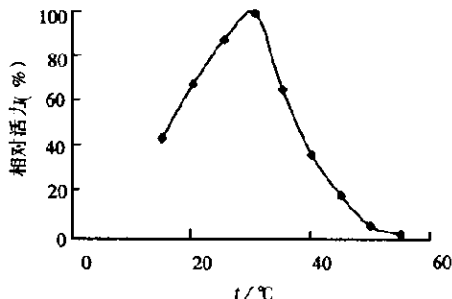


图4 温度对延胡索酸酶活力的影响

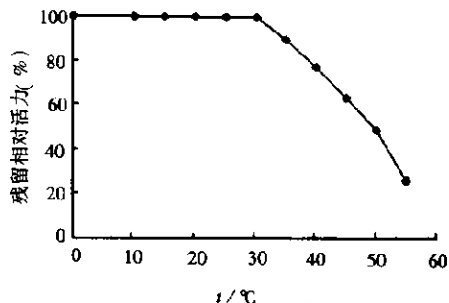


图5 温特曲霉 F-371 延胡索酸酶的热稳定性

技术。利用霉菌的一步发酵法和霉菌加细菌或酵母的二步发酵法虽优于化学合成法和固定化技术,但却有产量低、周期长、品质不稳定等缺陷。近来以延胡索酸为原料细胞转化法生产 L-苹果酸以产酸水平高、发酵周期短、成本低廉、操作简单等优势引起学术界的关注,该方法的关键就是延胡索酸酶的活力,基于本文对 L-苹果酸生产菌温特曲霉胞内延胡索酸酶的提纯及酶学特性作了初步的探讨,研究发现酶作用的最适温度为 30℃,酶作用的最适 pH 为 8.0,稳定 pH 范围为 6.0~8.5,酶在 35℃下保温 30 min 后仍残留约 90% 以上的活力,为细胞转化法合成 L-苹果酸提供了一定的依据。

我们虽然在延胡索酸酶的提纯和特性方面做了部分工作,但由于时间和实验条件等因素的限制未能对酶的分子量、酶动力学等方面做深入的研究,实验经几次重复但未进行统计学分析,今后我们将在这些方面深入探索。

参考文献

- [1] 沈同. 生物化学. 北京: 人民教育出版社, 1980.
- [2] Malcolm D, Edwin C W. Enzymes. London and Colchester: Longmans Press, 1958.
- [3] Ksanme P, Bernhard R, Georg S. Anal Gen Microbio, 1990, 136: 1537~1541.
- [4] Abelyan V A, Andreasyan N A. Prikl Brokhim Mikrobiol, 1992, 28 (4): 525~530.
- [5] Yoneya T, Jung Chang Min, Miyamoto T, et al. Tokubetsu Kenkyu Hokokusho-Shizuoka-Kenritsu Daigaku Tanki Daigakku, 1993 (Pub.1995), 83~94.
- [6] 杨康毓. 微生物学通报, 1980, 20 (3): 296~302.
- [7] 胡纯铿. 福建化工, 1999, (3): 46~48.
- [8] Yoav P, Barry S, Israel G. Appi Micrbiol Biotechnol, 1988, 28: 69~75.
- [9] Kszahiro H, Michiya S. J Chromatogr, 1985, 319: 173~185.
- [10] Keiko K, Tomoko Y, Syozo T. J Biochem, 89 (6): 1923~1931.