

果胶裂解酶的分离、提纯及其特征

周人纲 白玉山 K. Gierschner*

(河北省农科院农业物理生理生化研究所, 石家庄)

摘要 用等电聚焦层析方法从酶制剂 Pectinex Ultra SP-L 中分离获得制备标准的内切果胶裂解酶 (PL), 并测定了这个内切-PL 的一些重要物理、化学及生物化学特性。用分析用等电聚焦电泳, 生物化学反应及薄层层析证明所制备的 PL 为纯品。所制备的内切-PL 的一些特性数据如下: $pI: pH = 3.9, K_m = 1.91 \text{ mg/ml}, V_{max} = 0.88 \text{ 单位/min}$ 。用苹果果胶(酯化度为 71%)为底物时, PL 的最适 pH 为 6.0, 最适温度是 60℃。用 H-果胶(酯化度为 94%)为底物时, 作用的最适 pH 为 8.5, 最适温度是 65℃。所制备的 PL 是高温稳定和 pH 稳定的。PL 的活性被 Na^+ 激活。

关键词 果胶裂解酶; 等电聚焦层析; 黑曲霉

酶应用于果汁的澄清已有 50 多年的历史。在现代果汁生产中, 果胶酶的应用更是不可缺少的。果胶裂解酶 (PL) 是果胶酶的一种, 它催化果胶分子链的 β -消除裂解, 在食品加工工业中, 提高果汁产量方面有重要意义。1960 年 Albersheim 第一次从商品酶制剂 pectinolR-10 中发现了果胶裂解酶^[1], 1962 年他从这个商品

酶制剂中提纯获得了 PL, 并研究了 PL 的性质^[2]。以后相继有人用凝胶过滤和离子交换层析等技术从真菌培养物^[3,4]及细菌培养物^[5]中分

* K. Gierschner 德意志联邦共和国霍恩海姆大学食品技术系教授。

本文是作者在德意志联邦共和国霍恩海姆大学食品技术系进修期间在 K. Gierschner 教授指导下进行的研究工作的一部分。

离得到纯的 PL。本文用等电聚焦层析技术从酶制剂 Pectinex ultra SP-L 中制备纯的 PL。为果胶裂解酶的制备提供一个快速的方法。

材料与方 法

粗酶制品是丹麦 Novo 公司的 Pectinex ultra SP-L。Pectinex ultra SP-L 是由黑曲霉 *Aspergillus niger* 发酵获得的。

1. 等电聚焦层析: 粗酶制品先用 Sephadex G-25 柱 (PD-10 pharmacia 产品) 脱盐, 洗脱液加硫酸铵至 60% 饱和度, 4℃ 下 14,000g 离心 20 分钟 (离心机: Beckman Model J2-21) 收集沉淀, 沉淀用上柱缓冲液 (0.025mol/l) bis-Tris-HCl pH 6.3) 溶解, 并对上柱缓冲液透析除盐。1ml 蛋白浓度为 15mg/ml 的酶液经膜 (0.2 μ m Sartorius 产品) 过滤后, 加到等电聚焦层析柱上 (Mono-P 柱)。进样、分离、检测和收集过程均用 pharmacia 的高速液相色谱 (FPLC) 控制。用 10% polybuffer 74 (pharmacia)-HCl, pH 4.0 缓冲液冲洗, 流速 0.5ml/min。用 UV-检测仪 (280nm) 进行峰的检测。pH 检测仪检测 pH 的改变, 用部分收集器收集洗脱液, 测定每管洗脱液中的 PL 活性。收集峰 II 部分用 20% PEG-20,000 浓缩, 浓缩液用第二种上柱缓冲液 (0.025mol/L N-甲基哌嗪-HCl, pH 5.7) 稀释过滤后, 1ml 样品加到等电聚焦层析柱 Mono-P 上, 用以上同样的洗脱液和条件进行分离收集。收集有 PL 活性的部分。

2. 果胶裂解酶的活性测定根据 Ishii^[4] 略作改变: 反应介质为 0.5% 的苹果果胶 (Sigma 产品) 液 2.5ml (用 0.1mol/L 柠檬酸-0.2mol/L Na₂HPO₄, pH 5.5 缓冲液配制), 加 0.5ml 适当稀释的酶液, 40℃, 在 235nm 处 (Beckman DU-64 分光光度计) 测定消光值的增加。在实验条件下, 每分钟消光值增加 1 所需要的酶量定为 1 单位。

3. 果胶裂解酶活性根据 Macmillan^[6] 方法测定。反应介质含有 0.1mol/L Tris-HCl pH 8.0, 1% 的聚半乳糖醛酸钠, 0.5mol/L CaCl₂

和适量的酶, 40℃, 在 235nm 处测消光值的增加。

4. 果胶酯酶活性快速测定按照 Dörreich^[7] 方法。

5. 可溶性蛋白含量按照 Bio-Rad Protein Assay^[8] 方法测定。

6. 分析用等电聚焦电泳根据 Serva^[9] 的步骤制备 0.15mm 厚、5% 丙烯酰胺, 3% Servalyt pH 3—10 的聚丙烯酰胺凝胶。电泳在 5W 的恒功率下进行, 开始电流为 20mA, 最终电压为 1750V。考马斯亮蓝 R-250 染色。Serva 生产的 Proteintestmischung 9 作为标准蛋白。

7. 薄层层析根据 Omran^[10] 方法。样品制备: 1.5% 果胶溶液 (用 0.1mol/L HAc-NaAc, pH 5.5 缓冲液配制); 1.5% 聚半乳糖醛酸钠溶液 (用 0.1mol/L HAc-NaAc pH 5.0 缓冲液配制), 以上溶液每 ml 分别加 0.4 单位的 PL 酶液, 40℃ 水浴中反应 1 小时, 作为层析样品。用饱和的寡半乳糖醛酸 (1-6 聚体) 和不饱和的寡半乳糖醛酸 (1-3 聚体) 作为对照。固定相是硅胶 60, DC-板 (March 产品), 流动相, 正丁醇: 甲酸: 水 = 2:3:1, 室温下进行二次, 每次 2.5 小时, 显色剂为 0.5% 香草醛溶液。

8. 高酯化度果胶 (H-果胶) 的制备: 1.5 克苹果果胶与 45ml 三氟化硼-甲醇溶液在 80℃ 水浴中加热 1 小时, 反应产物用丙酮冲洗后晾干。

9. 果胶的酯化度根据 Schultz^[11] 的滴定法测定。

10. 果胶分子量根据 Owens^[12] 粘度法测定。用粘度计系统 AVS400 (Schott 产品), 2ml 粘度计 ($k = 0.01110$) 测定。

结果与讨论

1. 用等电聚焦层析方法从 Pectinex Ultra SP-L 中分离制备 PL: 因为酶制剂是储存在盐溶液中, 所以在加硫酸铵以前必须先脱盐。在用 60% 饱和度硫酸铵获得的沉淀中, 保存有 97% 的 PL 活性, 同时去掉 40% 其他蛋白质。将酶液加到 FPLC 的 Mono-P 柱之前, 该柱要用

缓冲液(0.025mol/L bis-Tris-HCl pH6.3)平衡。用10% polybuffer 74-HCl pH4.0缓冲液冲洗。图1是第一次等电聚焦层析的层析

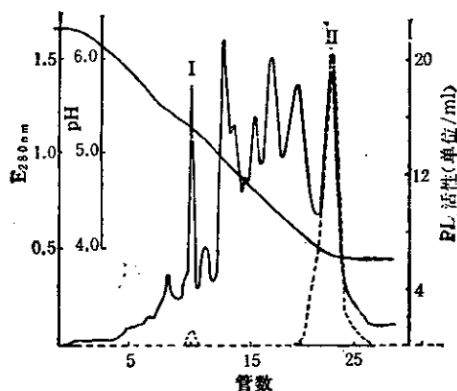


图1 从 Pectinex Ultra SP-L 中分离果胶裂解酶的等电聚焦层析图
—— 280nm 处吸收, PL 活性

图。从图中可以看到,在洗脱过程中,洗脱液的pH从6.3下降到4.0,并出现许多蛋白峰,仅在峰I和峰II发现有PL活性。但峰I的PL活性仅占峰I和峰II总和的4%,因此峰I部分被弃去。收集峰II的洗脱液进行再次等电聚焦层析,上柱缓冲液为0.025mol/L N-甲基哌嗪-HCl pH5.7,冲洗液仍为10% polybuffer 74-HCl pH4.0,收集洗脱液,层析图见图2,从图2中看到,在冲洗过程中,洗脱液pH从5.7下降到4.0,仅有一个大蛋白峰,此蛋白峰与PL活

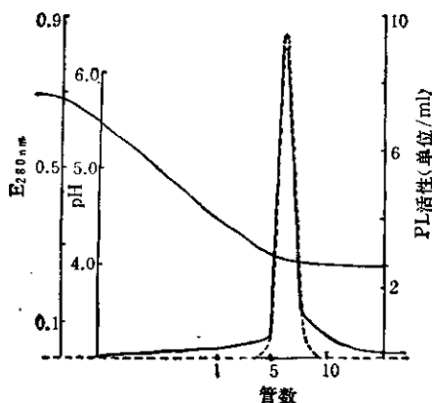


图2 果胶裂解酶的第二次等电聚焦层析图
——在280nm处吸收, PL 活性

性峰重合,收集这个峰的洗脱液为提纯的PL酶液。

与 Albersheim^[2]、Ishii^[4]、Tsuyumu^[23] 的提纯的PL的方法相比较,用等电聚焦层析方法提纯PL可以减少操作步骤,并获得较高产率(表1)。

表1 从 Pectinex ultra SP-L 中制备果胶裂解酶

步骤	蛋白含量(mg)	总活性(单位)	比活(单位/mg蛋白)	提纯因子	产率(%)
用 PD-10 柱脱盐后的原酶	270	761	2.82	1	100
60%饱和度硫酸铵沉淀	160	734	4.59	1.63	96.5
第一次等电聚焦层析(Mono-P)	16.5	347	21.00	7.4	46
第二次等电聚焦层析	4.6	230	50.00	17.7	30

2. 制备的PL纯度的检验: 分析用等电聚焦电泳检验制备的PL的纯度,从图3中可以看到样品中仅在pH3.9处有一条带。

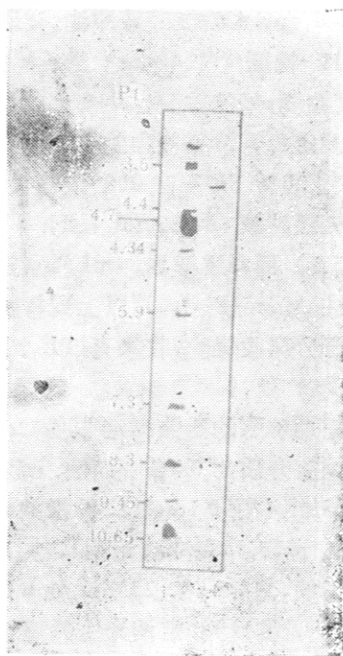


图3 从 Pectinex Ultra SP-L 提纯的果胶裂解酶的等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳图
1. Proteintestmischung 9, 5 μl 2. 酶液 3μl

果胶酸裂解酶和果胶酯酶的活性测定表明在制备的PL酶液中均无以上二种酶的存在。

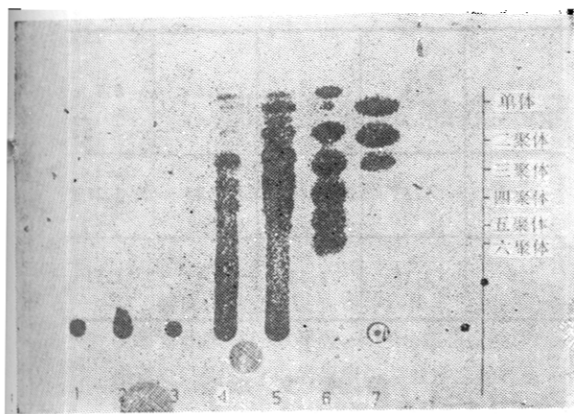


图4 PL裂解各种底物的裂解产物的薄层层析图

样品	加样量(μ l)
1.1.5% 苹果果胶溶液+失活的 PL	10
2.1.5% H-果胶溶液+失活的 PL	10
3.1.5% 聚半乳糖醛酸钠溶液+PL	10
4.1.5% 苹果果胶溶液+PL	30
5.1.5% H-果胶溶液+PL	30
6.饱和的1-6 寡半乳糖醛酸 (10mg/ml)	8
7.不饱和1-3 寡半乳糖醛酸 (10mg/ml)	8

用薄层层析检查制备的 PL 作用不同底物的分解产物,从图 4 中可以看到,所制备的 PL 不作用于聚半乳糖醛酸钠(样品 3),仅分解苹果果胶和 H-果胶,产生一系列的寡糖以及少量的单糖(样品 4、5),这表明酶液中没有聚半乳糖醛酸酶,而且获得的 PL 为内切-果胶裂解酶。从样品 4、5 的分解产物中可以看到,这个内切-PL 对高酯化度的 H-果胶比相对低酯化度的苹果果胶有较高的活性。

3. 内切-果胶裂解酶的特性: 供 PL 特性研究的二种果胶: 苹果果胶的分子量为 41,000, 酯化度 71%。H-果胶的分子量为 11,600, 酯化度为 94%。

(1) 酶作用的最适 pH: 用苹果果胶作底物时, PL 作用的最适 pH 为 6.0, 这与 Ishii^[4] 所制备的 PL 的最适 pH 值是相同的。用 H-果胶作底物时, PL 作用的最适 pH 为 8.5。

(2) 酶作用的最适温度: 用苹果果胶作底物时, PL 作用的最适温度在 60℃, 在 60℃ 时 PL 的活性是 40℃ 或 30℃ 时的 2.1 倍或 3.7 倍。65℃ 以后 PL 活性迅速下降。用 H-果胶作底物时, PL 作用的最适温度是 65℃。

(3) PL 的 pH 稳定性: PL 在 pH7.0 时最为稳定, 在 pH2.9—10.87 范围内, PL 都是相对稳定的。但在非常酸性的介质中, PL 很不稳定。PL 在 pH2.9 和 pH10.87 的介质中, 25℃ 下放置 24 小时, 相对活性分别是 74.3% 和 69.3%, 而在 pH2.0 的介质中, 同样条件处理, 活性下降至原来活性的 5.6%。

(4) PL 的温度稳定性: 在 60℃ 以下的范围内, PL 是相对稳定的。在 50℃ 下处理 5 分钟, 活性下降 5%, 在 65℃ 处理条件下, 活性下降 23.3%, 65℃ 以上处理 PL 活性迅速下降, 75℃ 处理条件下, 相对活性仅剩 4.5%。这表明本实验制备的 PL 是相对热稳定的。分离获得的 PL 在 pH4.0 的缓冲液中, 在 2℃ 的冷室中贮藏 30 天, 仅失去 5% 的活性。

(5) 米氏常数和最大速度的测定: 图 5a 是本文制备的 PL 的 Lineweaver-Burk 图。根据 Dixon 和 Wenn^[4], 这种类型图证明酶有一个可能的底物抑制。但在较大的 1/S 值范围内(即较小的底物浓度范围内), 这个图是呈直线型的。根据 Lineweaver-Burk 图的较大 1/S 值部分作直线回归(图 5b), 获得下列常数: $V_{max} = 0.88$ 单位/分, $k_m = 1.91$ mg/ml

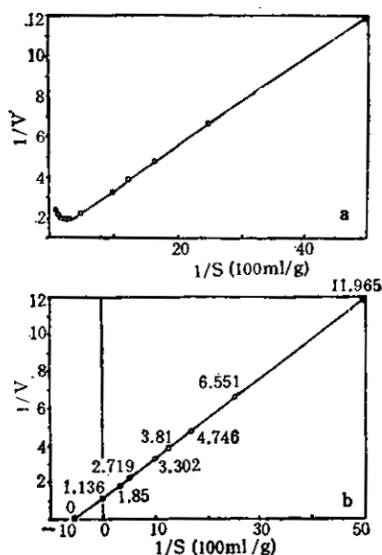


图5. a. PL 的 Lineweaver-Burk 图
b. K_m 和 V_{max} 的测定

表 2 Na⁺ 对 PL 活性的影响

相对活性 缓冲液	另加 NaCl (mol/L)							
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
0.2mol/L HAc-NaAc pH5.6 缓冲液	1	1.16	1.28	1.37	1.43	1.46	1.35	1.28
0.2mol/L Tris-HAc pH7.0 缓冲液	1	1.55	1.76	2.0	2.18	2.32	2.42	2.55

(6) Na⁺ 对 PL 活性的影响: PL 活性随着 Na⁺ 浓度的增大而增高 (见表 2)。用 0.2 mol/L HAc-NaAc pH5.6 缓冲液 (在此缓冲液中 Na⁺ 浓度为 0.182mol/L), 另加 NaCl 使 Na⁺ 浓度提高 0.5mol/L, 测得的 PL 活性是不另加 NaCl 时的 1.46 倍。用 0.2mol/L Tris-HAc pH7.0 的缓冲液 (在此缓冲液中无 Na⁺), 另加 NaCl 使 Na⁺ 浓度达 0.7mol/L, 测得的 PL 活性是没有 Na⁺ 时的 2.55 倍。这表明本实验制备的 PL 能被 Na⁺ 激活。因此在应用含有 Na⁺ 的缓冲液测定 PL 活性时, 必须考虑 Na⁺ 的激活作用。由于以上原因, 用一系列不同 pH 值但含有相同的 Na⁺ 浓度的缓冲液再次进行最适 pH 测定。以苹果果胶为底物时, PL 作用的最适 pH 为 6.3, 以 H-果胶为底物时, PL 作用的最适 pH 为 8.2。

(7) PL 的等电点测定: 用分析用等电聚焦电泳测定 PL 的等电点为 pH3.9 (图 3)。这是一个酸性蛋白。Albersheim^[2] 分离提纯获得的 PL 的等电点在 pH 3—4 范围内, Ishii^[4] 从 *A. japonicus* 分离获得的 PL 的等电点为 7.7。

参 考 文 献

- [1] Albersheim, P. et al: *Helv. Chim. Acta*, **43**: 1422, 1960.
- [2] Albersheim, P. and V. Killias: *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**: 107—115, 1962.
- [3] Edstrom, R. O. and H. J. Phaff: *Biol. Chem.*, **239**: 2403—2408, 1964.
- [4] Ishii, S. and T. Yokotsuka: *Agr. Biol. Chem.*, **39**(2): 313—321, 1975.
- [5] Schlemmer, A. E. et al.: *J. Bacteriol.*, **167**: 4493—4498, 1987.
- [6] Macmillan, J. D. and H. J. Phaff: *Methods in Enzymology*, Vol. VIII, P. 632, 1966.
- [7] Dörreich, K. et al: *Lebensm-Wiss u-Technol.*, **19**: 464—468, 1986.
- [8] Bio-Rad Protein Assay: Bulletin 1069, Bio-Rad Laboratories Nr. 78—0790, U. S. A., 1979.
- [9] Serva Gel-Gieß-kit für Polyacrylamid und Agarose-Gele Kat Nr. 42938, Serva.
- [10] Omran, H. et al.: *Lebensm.-Wiss. und-Technol.*, **19**: 457—463, 1986.
- [11] Schultz, T. H.: In Whistler, R. L.: *Methods in Carbohydr. Chem.*, Academic Press, 1962.
- [12] Owens, H. S. et al: *J. Am. Chem. Soc.*, **68**: 1628—1633, 1946.
- [13] Tsuyumu, S. and T. Funakubo: *Physiological Plant Pathology*, **27**: 119—130, 1985.
- [14] Dixon, M: *Enzymes*, 3rd Edition, Longman Group Ltd. London, 1979.