

环糊精葡萄糖基转移酶分离纯化及酶学性质研究

闵伟红, 丁茵, 方丽

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 通过筛选和诱变获得一株高产环糊精葡萄糖基转移酶芽孢杆菌菌株, 研究该菌所产环糊精葡萄糖基转移酶的分离纯化及酶学性质, 结果显示: 发酵液经离心处理后, 采用硫酸铵溶液分步盐析、DEAE-cellulose 52 离子交换层析、Sephadex G-200 凝胶过滤层析方法得到电泳级环糊精葡萄糖基转移酶, SDS-PAGE 电泳显示该酶分子量为 33kD, 纯化倍数为 10, 得率为 14.4%。该酶反应的最适温度为 50℃, 在 40~60℃ 基本稳定, 最适 pH 值为 8.0, 在 pH6.0~10.0 范围内基本稳定。Fe²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺ 对该酶活力有明显的抑制作用。

关键词: 芽孢杆菌; 环糊精葡萄糖基转移酶; 纯化; 酶学性质

Isolation, Purification and Enzymatic Characteristics of Cyclodextrin Glucanotransferase

MIN Wei-hong, DING Yin, FANG Li

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) produced by a high-yield CGTase-producing strain of *Bacillus* that isolated from soil was isolated from the fermentation broth of this strain by ammonium sulphate fractional salting out and then sequentially purified by DEAE-cellulose DE-52 ion exchange chromatography and Sephadex G-200 gel filtration chromatography. The SDS-PAGE analysis indicated that the CGTase obtained by the above procedures was of electrophoresis grade, and its molecular weight was 33 kD. The purification multiple and the recovery rate were 10 and 14.4 %, respectively. The optimum reaction temperature of the CGTase was 50 °C, and this enzyme was stable in the range of 40–60 °C. Its optimum reaction pH was 8.0, and it was stable in the range of pH 6.0–10.0. The enzyme activity was strongly inhibited by Fe²⁺, Cu²⁺ and Mg²⁺.

Key words: *Bacillus*; cyclodextrin glucanotransferase; purification; enzymatic characteristics

中图分类号: TS234.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)13-0232-04

环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)可以通过催化环化, 耦合和歧化反应来降解淀粉, 主要作用是将淀粉和麦芽低聚糖通过环化反应生成环糊精。这种酶主要来自于细菌, 如 *B.circulans*^[1], *B.stearothophilus*^[2-3], *B.megaterium*^[4]等。环糊精(CD)是一种环状结构的低聚糖, 由 D-吡喃葡萄糖单元通过 α(1→4) 键键合而成。常见的环糊精有 α-CD、β-CD 及 γ-CD, 分别由六、七、八个葡萄糖单元构成。其分子结构为环状立体结构, 具有内腔疏水、外围亲水的独特特性, 可以与许多疏水化合物或功能基团形成包合物, 从而改变其理化性质, 这种独特的结构使其在食品、化工、医药、环保等行业得到广泛的应用^[5-8]。

本实验通过筛选和诱变育种获得一株高产环糊精葡萄糖基转移酶芽孢杆菌, 在此基础上对环糊精葡萄糖基转移酶的分离纯化及部分酶学性质进行研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

芽孢杆菌由本实验室自土壤中筛选并经诱变育种获得。

液体培养基: 玉米淀粉 1%, 酵母膏 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, Mg₂SO₄·7H₂O 0.02%, Na₂CO₃ 1%。

牛血清蛋白、DEAE-cellulose 52、Sephadex G-200、丙烯酰胺、透析袋 Sigma 公司; 其他药品均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

GE EPS301 电泳仪和 E260 电泳槽 Pharmacia 公司; 1700 紫外分光光度计 日本岛津公司; Z36HK 高速冷冻离心机 Hermlf 公司。

1.3 方法

1.3.1 环糊精葡萄糖基转移酶酶活力的测定

收稿日期: 2009-04-28

作者简介: 闵伟红(1971—), 女, 副教授, 博士, 主要从事发酵工程与粮油科学深加工技术研究。

E-mail: minwh2000@163.com

取 10 μ l 酶液与 0.2mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH8.55) 0.2ml 混合, 再加入马铃薯淀粉溶液 0.2ml, 振荡, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴 10min 后, 立即加入 0.5mol/L 醋酸 0.5ml 终止反应, 然后加入 0.005% 碘液显色, 同时以蒸馏水为空白, 不加酶液为对照, 在 700nm 波长下测定吸光度(A), 一个酶活单位定义为使吸光度下降 10% 的酶量。

一个酶活单位(U)=(a - b)/a \times 1000 \times 酶液稀释倍数
式中: a 为对照组的吸光度; b 为样品的吸光度。

1.3.2 粗酶液的制备

250ml 三角瓶装入液体培养基 50ml, 接种量为 3%, 于 33 $^{\circ}$ C, 180r/min 摇瓶培养 48h 后, 3000r/min 离心 15min, 收集上清液即为粗酶液。

1.3.3 硫酸铵盐析

取等量的粗酶液, 分别按 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 饱和度缓慢加入固体硫酸铵粉末(参照硫酸铵饱和度计算表 1(25 $^{\circ}$ C)方法), 4 $^{\circ}$ C 静置过夜后, 5000r/min 离心 15min, 检测上清液的酶活力, 以未加硫酸铵的粗酶液的酶活力为 100% 参照酶活, 确定分步盐析所需要的硫酸铵浓度。

1.3.4 DEAE-cellulose52 离子交换层析

取透析后经 PEG 20000(聚乙二醇 20000)浓缩的酶液 4ml, 加入已用 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH8.3)平衡过的 DEAE-Cellulose52 柱(ϕ 1.6cm \times 20cm)中, 静止吸附 1h 后, 以分别含有 0.01、0.02、0.03、0.04mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH 8.3)进行梯度洗脱, 流速为 12ml/h。280nm 紫外检测确定活性组分, 测定酶活后收集具有环糊精葡萄糖基转移酶活性的组分, 透析后用聚乙二醇浓缩备用。

1.3.5 Sephadex G-200 凝胶过滤层析

以 Sephadex G-200 为介质添装层析柱(ϕ 1.6cm \times 80cm), 将离子交换层析得到的活性组分用 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH8.3)洗脱, 280nm 紫外检测确定活性组分, 测定酶活后收集活性峰, 用聚乙二醇浓缩备用。

1.3.6 蛋白质含量的测定

Lowry 法, 以牛血清白蛋白作标样^[9]; 紫外吸收法测定洗脱样品中的 A_{280nm}。

1.3.7 环糊精葡萄糖基转移酶相对分子量测定

用 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定^[10], 浓缩胶质量分数 5%, 分离胶质量分数 12%, 考马斯亮蓝 G-250 染色。

1.3.8 环糊精葡萄糖基转移酶部分酶学性质

1.3.8.1 环糊精葡萄糖基转移酶最适作用温度

在不同温度下检测酶活力, 以酶活最高者为 100%, 其他温度条件下测得的酶活力折算为相对酶活力。

1.3.8.2 环糊精葡萄糖基转移酶热稳定性

将等量酶液在不同温度下保温 0.5、1、2h 后测定酶活力, 以酶活最高者为 100%, 其他条件下测得的酶活力折算为相对酶活力。

1.3.8.3 环糊精葡萄糖基转移酶最适作用 pH 值

配制 pH 5.0~11.0 的缓冲液, 分别按照酶活测定方法检测酶活力, 以最高酶活力的 pH 值为 100%。

1.3.8.4 环糊精葡萄糖基转移酶 pH 值稳定性

将酶液在 pH 5.0~11.0 的缓冲液中 40 $^{\circ}$ C 保温 0.5h 后, 测定酶活力, 以最高酶活力的 pH 值为 100%。

1.3.8.5 金属离子对环糊精葡萄糖基转移酶活性的影响

在等量酶液中加入不同的金属离子, 金属离子的最终浓度为 1mmol/L, 在 33 $^{\circ}$ C、pH7.0 时, 保温 0.5h 后测定酶活力, 以未加金属离子的酶活力为 100% 参照酶活。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵盐析

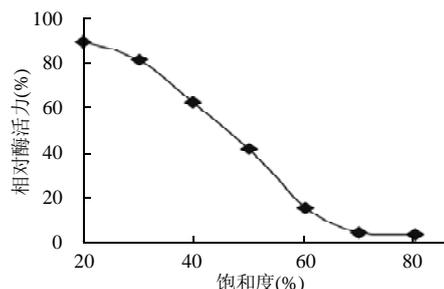


图1 硫酸铵盐析曲线

Fig.1 Salt-outting curve of CGTase

由图 1 可知, 当硫酸铵小于饱和度 20% 时, 上清液中环糊精葡萄糖基转移酶酶活力为原酶活力的 90%, 说明此时沉淀的为发酵液中的杂蛋白, 当硫酸铵饱和度的 20%~60% 范围内, 上清液中环糊精葡萄糖基转移酶活力迅速下降到原酶活力的 20% 以下, 因此, 在分离纯化过程中, 采用硫酸铵 20%、60% 饱和度的硫酸铵溶液分步盐析。

2.2 DEAE-cellulose52 离子交换层析

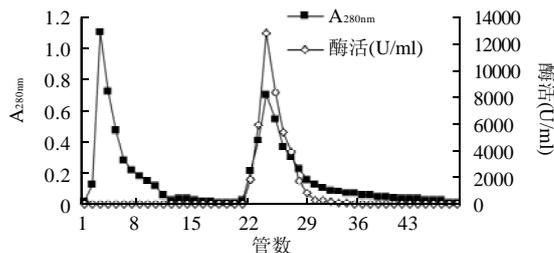


图2 离子交换层析图

Fig.2 Elution profile of CGTase on DEAE-cellulose DE-52 column

由图2可知,在280nm条件下,检测到两个蛋白质峰,测定酶活力,其中第一个蛋白质峰没有酶活力,说明先洗脱下来的是杂质蛋白,第二个蛋白质峰经检测具有环糊精葡萄糖基转移酶活力,说明洗脱下来的组分是主要活性组分。选择第二个活性组分进行下一步分离提纯,收集第二个活性峰的洗脱液,再经过透析除盐,PEG20000浓缩备用。

2.3 凝胶过滤层析

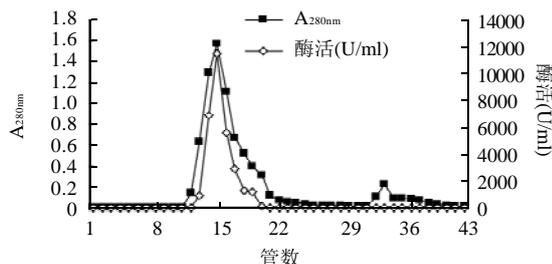
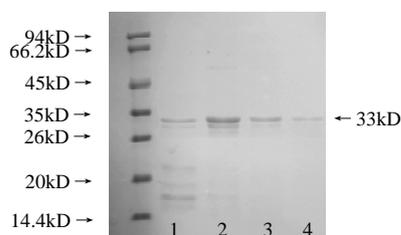


图3 凝胶过滤层析图

Fig.3 Elution profile of CGTase on Sephadex G-200 column

由图3可知,经过离子交换层析得到的活性成分采用凝胶层析柱分离,经缓冲液洗脱后出现两个组分峰,经过检测酶活,结果表明,环糊精葡萄糖基转移酶活性主要集中在第一个峰,收集第一组活性成分,采用SDS-PAGE检测其纯度及分子量。

2.4 环糊精葡萄糖基转移酶纯度及分子量的电泳鉴定



1.粗酶液;2.经硫酸铵盐析处理;3.经DEAE-cellulose 52处理;4.经Sephadex G-200处理。

图4 SDS-PAGE测定分子量

Fig.4 SDS-PAGE pattern of purified CGTase

由图4可知,该环糊精葡萄糖基转移酶在SDS-PAGE图谱呈现单一电泳带,证明采用上述纯化手段可以得到电泳纯酶,该酶分子量为33kD。

2.5 环糊精葡萄糖基转移酶的分离纯化结果

表1 环糊精葡萄糖基转移酶纯化结果

Table 1 Summary of isolation and purification procedures of CGTase

纯化步骤	总蛋白(mg)	总活力(U)	比活力(U/mg)	纯化倍数	得率(%)
粗酶液	1126	6.27×10^5	557	1	100
硫酸铵盐析	214	3.51×10^5	1640	2.94	56
离子交换层析	48.3	1.92×10^5	3410	6.12	30.6
凝胶过滤层析	16.2	9.03×10^4	5574	10	14.4

2.6 环糊精葡萄糖基转移酶部分酶学性质研究

2.6.1 环糊精葡萄糖基转移酶最适作用温度

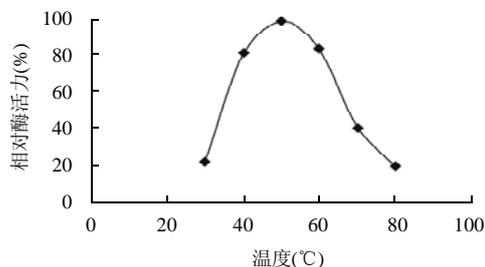


图5 环糊精葡萄糖基转移酶最适作用温度

Fig.5 Optimum reaction temperature of CGTase

如图5所示,该环糊精葡萄糖基转移酶的最适作用温度为50°C,在30~50°C范围内,随温度的升高,酶反应速度加快,酶活力升高;当温度在50°C时,酶活力达到最高值;当温度大于50°C时,该酶随温度的升高,酶反应速度减慢,酶活力迅速下降。由此可见,酶反应最适作用温度为50°C。

2.6.2 环糊精葡萄糖基转移酶热稳定性

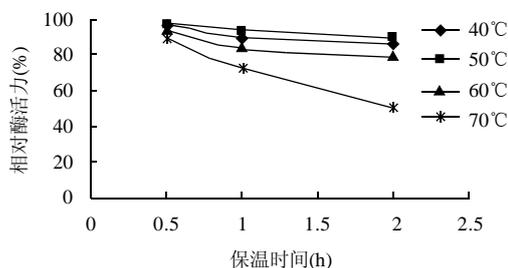


图6 环糊精葡萄糖基转移酶热稳定性

Fig.6 Thermal stability curve of CGTase activity

如图6所示,该酶在40、50、60°C时比较稳定,保温2h后酶活力保持82%以上,说明该酶对温度不太敏感,热稳定性较高。

2.6.3 环糊精葡萄糖基转移酶最适pH值

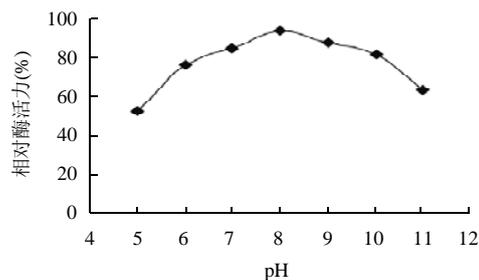


图7 酶的最适作用pH值曲线

Fig.7 Optimum reaction pH value of CGTase

由图7可知, 环糊精葡萄糖基转移酶在 pH6.0~10.0 范围内的相对酶活力均在 75% 以上, 其中在 pH 值为 8.0 时, 该酶活力达到最高峰; 在 pH 值低于 6.0 或高于 10.0 时, 酶活力都会迅速下降。

2.6.4 环糊精葡萄糖基转移酶 pH 值的稳定性

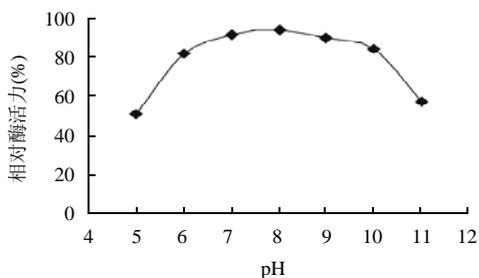


图8 pH 值对环糊精葡萄糖基转移酶稳定性的影响
Fig.8 pH stability curve of CGTase activity

从图8可知, 环糊精葡萄糖基转移酶稳定的 pH 值范围是 6.0~10.0, 在此范围内酶活力保存 82% 以上, pH 值在 8.0 条件下最稳定。pH 值小于 6.0 或 pH 值大于 10.0 的条件下, 该酶活力保存小于 60%。

2.6.5 金属离子对环糊精葡萄糖基转移酶活力的影响

表2 金属离子对环糊精葡萄糖基转移酶活性的影响
Table 2 Effects of metal ions on CGTase activity

离子	K ⁺	Fe ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺
浓度(mmol/L)	1	1	1	1	1	1	1
相对酶活力(%)	94.6	21.2	98.0	81.7	42.2	84.5	37.8

从表2可知, 所选的金属离子除 Ca²⁺、K⁺ 外, 其他金属离子对环糊精葡萄糖基转移酶有不同程度的抑制作用, 其抑制程度的大小依次为 Fe²⁺ > Cu²⁺ > Mg²⁺ > Na⁺ > Mn²⁺。

3 结论

本实验采用硫酸铵盐析、离子交换层析、凝胶层析方法对芽孢杆菌产环糊精葡萄糖基转移酶活性组分进行分离纯化, 得到电泳级纯度的酶组分, 纯化倍数为 10, 得率为 14.4%, 最适反应温度为 50℃, 在 40~60℃ 的范围内较稳定, 最适作用 pH 值为 8.0, 在 pH6.0~10.0 的范围内较稳定。SDS-PAGE 显示该酶相对分子质量为 33kD。从初步实验结果判断, 该酶与其他细菌所产的环糊精葡萄糖基转移酶不同, 是一种新的环糊精葡萄糖基转移酶, 有望应用到酶法生产环糊精的工艺中。

参考文献:

- [1] PONGSAWASDI P, YAGISAWA M. Purification and some properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*[J]. Agric Biol Chem, 1988, 52: 1099-1103.
- [2] KITAHATA S, OKADAS. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus sterothermophilus* TC-60[J]. J Jpn Soc Starch, 1982, 29: 7-12.
- [3] AHN J H, HWANG J B, KIM S H. Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*: purification by affinity chromatography and its properties[J]. J Appl Microbiol Biotech, 1990, 18: 585-590.
- [4] KITAHATA S, OKADA S. Action of cyclodextrin glycosyl transferase from *Bacillus megaterium* strain No on starch[J]. Agric Biol Chem, 1974, 12: 2413-2417.
- [5] BHANDARI B R, D, ARCY B R, PADUKKA I, et al. Encapsulation of lemon oil by paste method using β-cyclodextrin: encapsulation efficiency and profile of oil volatiles[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 5194-5197.
- [6] CITERNESI U, SCIACCHITANO M. Cyclodextrins in functional dermocosmetics[J]. Cosmetics and Toiletries, 1995, 111(3): 53-61.
- [7] RAJEWSKI R A, STELLA V J. Pharmaceutical applications of cyclodextrin. 2. *in vivo* drug delivery[J]. J Pharm Sci, 1996, 85(11): 1142-1169.
- [8] 周细红, 曾清如, 郭正元. β-环糊精对4种有机农药溶解度的影响[J]. 云南环境科学, 2003, 22(4): 11-12.
- [9] LOWRY O I, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-276.
- [10] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 216-223.