

右旋糖酐酶的底物吸附

孙晋武 程秀兰 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用 35% 乙醇保护, 底物右旋糖酐能对右旋糖酐酶有效地吸附。采用 0.2 mol/L pH8.0 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(内含 30% 乙醇)进行解吸, 总回收率在 80% 以上。粗酶液经此过程提纯了 9 倍。低温对吸附有利。在酶稳定范围内, pH 对吸附影响不大。酶浓度过高, 吸附效率下降。对稀酶液可连续多次吸附以达到浓缩目的。1.5% (W/V) 的右旋糖酐便可得到满意的吸附效果, 对五种不同来源的右旋糖酐酶吸附率都很高, 但不同来源的底物适用情况差别很大。

关键词 右旋糖酐酶; 右旋糖酐; 吸附

吸附法是酶发酵液纯化、浓缩的重要手段之一, 工业生产上用硅藻土、白土、活性氧化铝等对蛋白酶^[1]、 α -淀粉酶^[2]、葡萄糖异构酶^[3]、葡萄糖氧化酶^[4]等进行吸附提纯已成为一可行的工艺路线。底物与酶之间具亲和力, 用底物吸附酶, 其专一性强, 故具特殊意义。但由于底物易被酶降解, 要找到合适的材料及吸附、解吸的条件并非易事。工业生产上用膨化的玉米淀粉对 α -淀粉酶进行吸附是一较为成功的例子^[5]。

我们采用右旋糖酐, 在乙醇保护下对右旋糖酐酶 (EC 3.2.1.11) 进行底物吸附, 并进行了一系列吸附、解吸条件的试验, 取得了较为满意的结果。

材料和方法

(一) 化学试剂

右旋糖酐: 文中根据来源及分子量不同, 分别用符号表示, 其中 DexA 为天津西制药厂产品, 分子量在百万以上; DexB, 同上厂家生产, 分子量 7 万; DexC, 天津华津制药厂生产, 分子量 4 万; DexD,

医科院血液研究所惠赠, 分子量 1.7 万; DexE, 为瑞典 Pharmacia 产品, 型号 Dextran T2000 (分子量 200 万); DexF, 美国 Sigma 公司产品, 分子量为 50—400 万的粗制品。

(二) 右旋糖酐酶

所用的右旋糖酐酶液皆由本实验室发酵后离心所得, 浓酶液则是将稀酶液经超滤浓缩而成。除在文中专门指出, 一般酶液皆由淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 8523 菌所产生。

(三) 分析方法

右旋糖酐酶活力测定见前文^[6], 蛋白浓度按 Lowry 法测定^[7]。

实验结果

(一) 底物的直接吸附

称取不同来源及不同分子量的右旋糖酐 0.15g, 分别加入酶液 5ml, 于冰浴中不时搅拌 1.5 小时, 发现所试的六种右旋糖酐 (DexA—F) 全被降解而溶解, 此时溶

本文于 1988 年 10 月 12 日收到。

解液中保存了几乎全部酶活力，说明不对底物进行保护，无法对此酶进行吸附。

(二) 乙醇沉淀试验

在酶液中慢慢加入不同量的冷乙醇，以达到不同的乙醇终浓度，冰浴中放置 30 min，离心，沉淀溶于少量蒸馏水中，分别测其上清液及沉淀溶解液中的酶活力（图 1）。在乙醇浓度低于 40% 时，酶基本不被沉淀，而高于 60% 时皆被沉淀下来。

(三) 不同浓度乙醇存在下底物对酶的吸附

5ml 酶液，加 0.5ml 0.5mol/L pH5.2 醋酸缓冲液，然后滴加乙醇，使其终浓度分别为 0、10、20、30、35 和 40%，再加入 0.15g DexA，室温（25℃）下不时搅拌 1.5 小时，离心，测上清液中酶活力。由测定结果（表 1）可见，在乙醇浓度低于 20% 时，右

旋糖酐不同程度地被降解，在上清液中保存了全部酶活力。当乙醇浓度达 35—

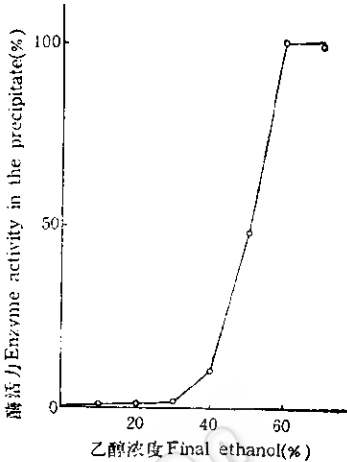


图 1 不同乙醇终浓度对右旋糖酐酶的沉淀曲线
Fig. 1 The precipitation curve of dextranase under different final ethanol concentration

表 1 不同浓度乙醇存在下，右旋糖酐对酶的吸附*

Table 1 Adsorption of dextranase by dextran under different final ethanol concentration

乙醇终浓度 Final ethanol Concentration (%)	上清液总酶活力 Total activity in supernatant (u)	上清液剩余酶活力 Residual activity in supernatant (%)	吸附率 Adsorption (%)	右旋糖酐被降解 情况* Degradation of dextran
0	470	107	0	+++
10	491	112	0	++
20	455	103	0	+
30	203	46	54	—
35	77	17	83	—
40	31	7	93	—
原酶液 Crude enzyme	440	100		

* +++: 15min 全部降解; ++: 30 min 基本降解;
+: 1.5 小时部分降解; — 未见降解
+++: Complete degradation in 15min;
++: Serious degradation in 30min;
+: Partial degradation in 1.5h;
—: No visible degradation

40% 时，上清液中已很少有酶活存在，而在同样乙醇浓度的不加右旋糖酐的对照液中，酶活几乎全被保存着。说明在此乙醇浓度下，乙醇不会造成酶的沉淀和失活，而右旋糖酐则能将酶有效地吸附住，其本身

也无明显的降解现象。

(四) 不同来源右旋糖酐对酶的吸附

5ml 酶液，0.5ml 0.5mol/L pH5.2 醋酸缓冲液，滴加乙醇使其终浓度为 40%，并加入不同来源的右旋糖酐 0.19g（终浓

度为 2%)，然后在室温下按上述方法进行吸附和测定上清液中残存的酶活力。由表 2 可见，国内生产的一些右旋糖酐，其吸附效果都不错，其中以 DexA 最好。而所试的两种国外来源的右旋糖酐，在 40% 乙醇条件下，仍能被酶全部降解，无法起到保护底物和吸附作用。

(五) 底物吸附容量试验

1. 不同量吸附剂的吸附：按上述方

法，乙醇最终浓度为 35%，加入不同剂量的 DexA，在室温下同样操作，最后测上清液的酶活(表 3)。吸附效率随加入吸附剂量的增加而增加，在吸附剂量大于 1.5% 后，吸附率在 85% 以上，说明对于酶发酵液，加入 1.5% 吸附剂就可以了。

2. 对不同浓度酶液的吸附：以浓酶液为起始材料进行不同程度的稀释，然后按上述方法进行吸附，乙醇最终浓度 35%，

表 2 不同来源的右旋糖酐对酶的吸附

Table 2 The adsorption ability of different dextrans

加入的右旋糖酐种类 The sorts of dextran	上清液总酶活力 Total activity in supernatant (u)	上清液剩余酶活力 Residual activity in supernatant (%)	吸附率 Adsorption (%)	吸附剂被降解情况* Degradation of dextran
Dex A	24.5	5.5	94.5	—
Dex B	89.3	20.0	80.0	—
Dex C	51.3	11.5	88.5	—
Dex D	110.2	24.6	75.4	—
Dex E	476.0	106.4	0	+
Dex F	495.0	110.6	0	+
不加吸附剂 No dextran added	447.5	100.0		

* —: 未见明显降解现象; +: 在 20 分钟内所有底物几乎全被降解

—: No visible degradation;

+: Almost complete degraded in 20min

表 3 不同剂量吸附剂对酶的吸附效果

Table 3 The adsorption of dextranase with different amount of adsorbent

吸附剂量 The amount of adsorbent (%)	上清液总酶活力 Total activity in supernatant (u)	上清液剩余酶活力 Residual activity in supernatant (%)	吸附率 Adsorption (%)
0	400.0	100.0	0
0.5	228.0	57.0	43.0
1.0	123.0	30.7	69.3
1.5	54.2	13.5	86.5
2.0	38.7	9.7	91.3
3.0	12.9	3.2	96.8
4.0	11.0	2.7	97.3

加入的吸附剂量为 2%，分别以同样条件下不加右旋糖酐的样品为对照。结果(表 4)表明：吸附率与酶浓度反相关。但由于

影响吸附的因素太多，难以得出一线性关系。

(六) 温度对吸附能力的影响

表 4 右旋糖酐对不同蛋白浓度酶液的吸附

Table 4 The adsorption of dextranase of different concentration

酶浓度 Enzyme concentration (mg/ml)	上清液总酶活力 Total activity in supernatant (u)	上清液剩余酶活力 Residual activity in supernatant (%)	吸附率 Adsorption (%)
4.6	2273.0	50.7	49.3
2.3	1006.0	45.3	54.7
1.2	354.0	32.7	67.3
0.6	77.4	15.3	84.7
0.3	12.9	4.4	95.6

表 5 温度对吸附能力的影响

Table 5 The effect of temperature on adsorption

吸附温度 Temperature (°C)	上清液总酶活 Total activity in supernatant (u)	剩余酶活力 Residual activity (%)	吸附率 Adsorption (%)
4	88.6	18.9	81.1
27	248.2	53.0	47.0
37	338.0	72.2	27.8
原酶液 Crude enzyme	468.0	100.0	

表 6 右旋糖酐对酶的反复吸附

Table 5 Repeated adsorption of dextranase by dextran

吸附次数 The adsorption times (n)	滤过液总酶活力 Total activity in filtrate (u)	滤过液酶活力 Residual activity in filtrate (%)	吸附率 Adsorption (%)
不加吸附剂 No adsorbent added	371.7	100.0	
n = 1	53.9	6.2	93.8
n = 2	69.5	8.0	92.0
n = 3	81.3	9.4	90.6
n = 4	116.6	13.4	86.6
n = 5	109.6	12.6	87.4
n = 6	128.8	14.3	85.2
n = 7	154.9	17.8	82.2
n = 8	154.9	17.8	82.8
n = 9	128.8	14.3	85.2
n = 10	154.9	17.8	82.2

在 1% 右旋糖酐和乙醇最终浓度为 35% 条件下, 试验了几种温度对吸附能力的影响。结果如表 5 所示, 随温度升高, 吸附效率下降。

(七) pH 对吸附能力的影响

所用酶液在 pH3.5—10.5 宽范围内

是稳定的^[6]。在此范围内选用几种 pH 缓冲液 (pH 4.2、6.2、7.2 和 8.0) 代替 pH5.2 醋酸缓冲液, 进行同样的吸附试验。结果表明, 在所试验的几种 pH 条件下, 吸附率相差无几 (数据从略)。

(八) 反复吸附试验

表7 不同解吸剂的解吸情况*
Table 7 The desorption with different solvents

解吸液成分** The composition of solvent	解吸后总酶活力 Total activity after desorption (u)	解吸率 Desorption (%)	酶活总回收率 Total recovery (%)
0.02mol/L pH5.2 HAC Buffer +0.1mol/L NaCl	0	0	0
0.2mol/L pH8.0 Tris-HCl Buffer	379.4	58.5	55.8
0.2mol/L pH8.0 Tris-HCl Buffer + 0.2mol/L NaCl	330.4	50.9	48.6
0.05mol/L pH5.0 K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ Buffer	0	0	0
0.05mol/L pH8.0 K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ Buffer + 0.1mol/L NaCl	0	0	0
0.1mol/L pH8.0 K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ Buffer	0	0	0
0.2mol/L pH8.0 K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ Buffer	636.3	93.1	93.6
0.2mol/L pH8.0 K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ Buffer + 0.2mol/L NaCl	589.4	90.8	86.6

* 用于本实验吸附的酶: 吸附前总酶活力 680.4u, 吸附后酶活回收 648.8u, 吸附率 95.4%。
** 所有解吸液中都含 30% 乙醇。
* The adsorbed enzyme in these experiments: total enzyme activity was 680.4u before adsorption, the adsorbed activity was 648.8u, the adsorption rate was 95.4%.
** All solvent containing 30% ethanol.

表8 对不同来源的右旋糖酐酶的吸附和解吸
Table 8 The adsorption and desorption of dextranases from different sources

产酶菌株 Enzyme-producing strain	吸附前总酶 活力 Total activity before adsorption (u)	滤出液总酶 活力 Total activity in filtrate (u)	吸附率 Adsorption (%)	解吸液总酶 活力 Total activity in solvent (u)	解吸率 Desorption (%)	酶活总回 收率 Total recovery (%)
<i>Asp. flavipes</i> 8501	966	90.7	90.6	824.5	94.2	85.3
<i>Asp. flavipes</i> 8514	1050	90.7	91.4	78.2	81.5	74.5
<i>Asp. ustus</i> 8519	766	67.0	91.3	667.0	95.4	87.1
<i>Paecilomyces lilacinus</i> 8523	680	31.0	95.4	636.0	98.1	93.6
<i>Asp. carneus</i> 8541	598.5	67.2	88.8	528.5	99.5	88.3

10ml 酶液, 0.05mol/L pH5.2 醋酸缓冲液, 35% 乙醇, 3% 右旋糖酐, 在冰浴中搅拌 45min, 抽滤后, 再在滤渣上加上同质量的酶-缓冲液-乙醇, 在冰浴条件下进

行第二次吸附。如此反复多次, 测定每次收集到的抽滤液, 计算吸附率(表6)。吸附率随反复次数的增多而略有下降, 但在此实验中连续吸附 10 次, 吸附率仍较高。

(九) 解吸条件

对经上述方法吸附在底物上的酶, 先用 30% 乙醇冲洗, 抽滤二次(经检查, 无酶活被解吸下来), 然后试用几种皆含 30% 乙醇的洗脱液进行解吸, 测定滤过液中的酶活, 便得解吸率。由表 7 可见, 在所试条件中, 以 0.2mol/L pH8.0 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液效果最好, 解吸率在 90% 以上。另外根据经验, 若在 4℃ 进行吸附, 在室温或 37℃ 进行解吸, 并采用少量多次的办法, 可达最佳解吸效果。此外采用此法, 或经反复吸附, 一次解吸, 可将数百毫升的酶液浓缩成数十毫升。

(十) 不同来源的右旋糖酐酶的吸附和解吸

对五种不同来源的右旋糖酐酶^[6]进行了吸附和解吸试验。由表 8 可见, 采用此法对所试的几种不同来源的酶都能很好地吸附和解吸。

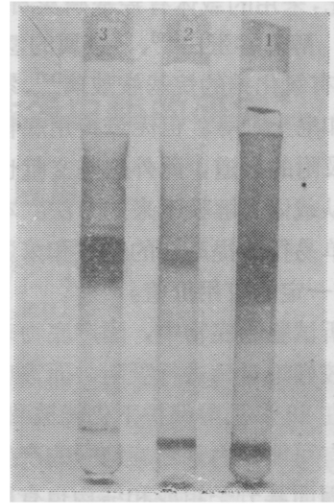


图2 淡紫拟青霉 8523 菌右旋糖酐酶液经吸附纯化后的聚丙烯酰胺凝胶电泳模式

1. 粗酶液; 2. 吸附后的滤过液; 3. 解吸后的滤过液

Fig. 2 The PAGE pattern of dextranase sample from *Paecilomyces lilacinus* 8523

before and after substrate adsorption

1. Crude enzyme; 2. Filtrate after adsorption;

3. Filtrate after desorption

表 9 淡紫拟青霉 8523 菌的酶液经底物吸附前后的纯度变化

Table 9 The purity of dextranase from *Paecilomyces lilacinus* 8523 before and after substrate adsorption

	蛋白浓度 Protein concn. (mg/ml)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)	比活力 Specific activity (u/mg)	提纯倍数 Purification fold
吸附前 Before adsorption	1.45	78.7	54.3	1
解吸后 After desorption	0.28	136.9	489	9

(十一) 酶经底物吸附后纯度的变化

由于底物与酶具专一性亲和力, 经此吸附和解吸, 理应对酶的纯度有一定好处。表 9 列出淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 8523 菌酶液经此步骤后的提纯情况, 图 2 则为该酶液在此步骤前后的凝胶电泳模式。由于此酶具多型性^[6], 经此步骤后酶的主要区带仍保留着, 而一些杂蛋白细带则减少了。

讨 论

酶的底物吸附因其专一性强而具特殊意义, 但因底物易被酶降解, 故成功的例子并不太多。我们用乙醇保护, 对该酶进行的吸附和解吸, 总回收率在 80% 以上, 并使酶的纯度提高了 9 倍, 为底物吸附酶进行浓缩纯化提供了一个成功的例子。

已有不少文献论及右旋糖酐酶的吸附

和固定化,采用的载体有羟基磷灰石^[8]、纤维素^[9]、醇溶谷蛋白^[10]、金属的氢氧化物^[11]、涂有氧化锆的烷基胺玻璃^[12]、聚砜超滤膜^[13]和皂土^[14]等。但无直接用底物对该酶进行吸附的报道,此外这些文献也未论及将酶从载体上解吸下来的方法。本文报道经简单易行的提高酶的纯度和浓度的方法,具有一定的应用价值。

在所试验的底物中,国产底物采用此法都能较好地对酶进行吸附,而进口的两种底物在 40% 乙醇保护下仍能被酶降解。其原因有可能是由于右旋糖酐的产生菌株不同,因而其分子组成和结构也有所不同所致。

由于吸附是一复杂过程^[5],影响吸附的因素很多,因而实验数据波动较大,但从本实验的结果来看仍可得出一些规律性的东西。

参 考 文 献

- [1] 胡学智: 酶制剂工业 (张树政主编), 科学出版社, 北京, p. 405, 1984。
- [2] 胡学智, 朱庆裴: 同上, p. 474。
- [3] 胡学智: 同上, p. 579—581。
- [4] 杜钟: 同上, p. 587。
- [5] 伦世仪: 同上, p. 208—211。
- [6] 孙晋武等: 微生物学报, 28(1): 45—55, 1988。
- [7] Lowry, D. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193(1): 265—275, 1951。
- [8] Kuboki, Y. et al.: 日本公开特许公报, JP62 59, 988, 1987。
- [9] Cheetham, N. W. H. et al.: *Carbohydr. Res.*, 30(1): 99—107, 1973。
- [10] Kanebo 公司: 日本公开特许公报, JP57 174, 090, 1982。
- [11] Kennedy, J. F. et al.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 9: 962—967, 1976。
- [12] Ramesh, V. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97(2): 779—786, 1980。
- [13] Staude, E. et al.: *Angew. Makromol. Chem.*, 96: 21—36, 1981。
- [14] Madhu et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 279—282, 1985。

THE SUBSTRATE ADSORPTION OF DEXTRANASE

Sun Jinwu Cheng Xiulan Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Protecting with 35% ethanol, substrate dextran can adsorb dextranase (EC 3.2.1.11) efficiently. Desorbing with 0.2 mol/L pH 8.0 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer (containing 30% ethanol), the total recovery of enzymatic activity was more than 80%, and specific activity increased 9 times. Lower temperature was favourable to adsorption. The effect of pH on adsorption within the pH range of enzyme stable was little. High enzyme concentration decreased the adsorption rate. For dilute enzyme solution, adsorbent can be used for

several times still keeping higher adsorption rate. Usually, 1.5% (W/V) of dextran offered satisfactory results. This method was suitable for the adsorption of dextranases from 5 different strains we tested, but there was a big difference between dextrans with different origin.

Key words

Dextranase; Dextran; Adsorption